

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Transformación hemorrágica en el ictus isquémico:
desarrollo de un modelo experimental y efecto de la sobrecarga de hierro**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isaac García de Yébenes y Castro

Directores

Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Antoni Dávalos Errando

Madrid, 2014

Transformación hemorrágica en el ictus isquémico: desarrollo de un modelo experimental y efecto de la sobrecarga de hierro



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología

Directores de Tesis:
Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Antoni Dávalos Errando

Isaac García de Yébenes y Castro
Madrid, 2014

*A mis padres, Luis y Adela,
porque os quiero,
por enseñarme que mi mayor miedo es perderos.*

*A mi abuela, Chiqui,
por ver crecer a un crío
y transformarme en niño.*

AGRADECIMIENTOS

*Que la vida iba en serio
uno lo empieza a comprender más tarde
-como todos los jóvenes, yo vine
a llevarme la vida por delante.*

*Dejar huella quería
y marcharme entre aplausos
-envejecer, morir, eran tan sólo
las dimensiones del teatro.*

*Pero ha pasado el tiempo
y la verdad desagradable asoma:
envejecer, morir,
es el único argumento de la obra.*

Con estas palabras de Jaime Gil de Biedma recibía Madrid y su Ciudad Universitaria a un chiquillo de un pequeño pueblo de Segovia, el mismo en donde el autor pasó su juventud y escribió gran parte de su obra. Unos años después y ya no tan chiquillo, aunque aún un crío, me acogían con las mismas líneas María Ángeles y Nacho, en su “panfleto para principiantes”. Hoy me encuentro sorprendiéndome a mí mismo y empezando unos agradecimientos con esos versos que tantas veces he leído sin darles importancia y que ahora, resulta, resumen perfectamente estos últimos años. ¡Qué curiosa analogía! Quizá hoy comienzo a comprender que, realmente, la vida iba en serio.

Mi elección por la investigación fue pura vocación. Las miles de preguntas que tenía y la ilusión y determinación por descubrir sus respuestas me llevaron a estudiar biología, absolutamente seguro de que era el camino para hacer ciencia. Mi madre me recuerda a veces mi primer día de facultad, cuando llamé entusiasmado diciendo que toda mi vida tenía sentido sólo por llegar a ese momento. Mi padre aún evoca aquel crío que, estudiando la fecundación de una simple flor, admiraba la belleza y perfección con la que es creado todo. Qué lejos se antojan ahora aquellos tiempos sin preocupaciones ni complejos, ¡qué lejos!

Inicié el doctorado como el siguiente paso lógico hacia la investigación. Eso sí, sin saber muy bien cuándo, perdí aquel carro de ilusiones que me había traído a Madrid y me lastré de miedos e inseguridades. Lidar con mis propios fantasmas ha sido duro, claro; algunos lo llaman crecer. También ha sido PRECIOSO, con mayúsculas, y me ha ayudado a moldear la esencia de quién soy. Esta búsqueda de mí mismo ha cincelado mi etapa de doctorado, tanto, que lo primero que quiero decir no es gracias, sino PERDÓN. Perdón por apartaros y refugiarme en la soledad, por esos momentos en los que me ha dominado el enfado y por todos días que me he olvidado de sonreír.

Mi primer agradecimiento es para aquellos que más lo han sufrido: mi familia. Gracias a mis padres, Luis y Adela, por empujarme a salir de casa cuando no quise hacerlo. Gracias por los valores y educación que me habéis dado, que han sido mi mejor arma en los peores momentos. Por preocuparos, por escucharme, el apoyo y los consejos. Pero, sobre todo, gracias por vuestro respeto, por la libertad que me dais para andar mi propio camino, aunque para vosotros signifique sufrimiento. Y gracias por quererme a pesar de ello.

Gracias a mi abuela, Chiqui, por tu paciencia infinita, por no decir jamás una palabra más alta que otra. Gracias porque me has acogido, alimentado y vestido. Gracias por rascarme por las noches tumbada en tu cama y preguntarme: y el día, ¿cómo ha ido? Gracias por enseñarme la palabra ternura, por ver crecer a un crío y transformarme en niño.

Gracias a mis hermanos, Juan, Virginia, Manuel, Rosa, Ana, Jose y Francisco. Porque me habéis dado la mejor infancia que nadie pueda tener, tanto, que ahora no quiero crecer. Por los planes de adolescentes, por nuestro tiempo juntos en Madrid. Gracias, porque sólo con vosotros me dejo de esconder.

Gracias también a Claudia, por llenar de nuevo mi vida de magia y fantasía. Porque tan sólo el verte convierte en un dulce sueño la peor de mis pesadillas. Gracias a todos vosotros, que sois lo que más quiero, porque me habéis enseñado que mi mayor miedo no es otro que perderos.

Dicen que hacer una tesis doctoral no es tarea fácil. Si, además, estás tan tarado como yo supongo que menos, claro. Sin embargo, para mí ha sido sencillo: tuve la gran suerte de que mis tíos, Justo y María Ángeles, me aconsejaron llamar a la puerta de un laboratorio donde me he encontrado con un maravilloso grupo científico y humano. Ellos, y no yo, son los verdaderos artífices de este trabajo.

Mi mayor GRACIAS a María Ángeles y Nacho, mis padres científicos. Por darme la oportunidad de trabajar con vosotros y con un grupo tan sano y variado como el que lideráis. Gracias por compartir vuestra excelencia y visión conmigo, por formarme como científico en tan variados aspectos, por preocuparos de que APRENDA y de mi vida profesional más, incluso, que yo mismo. Gracias por señalar esa coma perdida y cambiar esa gráfica sin sentido, por enseñarme la importancia de ser minucioso y resolutivo. También GRACIAS por dejar siempre esa puerta abierta, por vuestra franqueza, por el respeto y el cariño a pesar de las diferencias.

Gracias a Toni, por confiar en mí para tu proyecto, porque cada vez que hablas aprendo, por esas reuniones con Teresa, Natalia, Mar y Joaquín, porque aportan ese punto de vista que tanto sentido da a todo lo que he hecho.

Gracias también a todos los que hicieron posible mi estancia en Boston, donde viví una gran experiencia profesional y personal. Gracias a Eng, Xiaoying y Xiang por permitirme trabajar y aprender de ellos. Gracias también a Angel, Loc, Wendy, Ji Hae, Elga, Maria, Giulia y Carla, que me aceptaron como soy y me mostraron el inicio del camino.

Gracias a Pilar y Carlos, por vuestra colaboración en este último tiempo, por el trabajo en equipo y la disposición a enseñarme.

Cómo no, quiero agradecer a mis compañeros todos los años con ellos. Muy en especial a las dos personas que estuvieron conmigo en mis peores momentos, los iniciales. Sé que sin su apoyo no estaría hoy escribiendo estas líneas:

- Gracias, Marta, por acogerme en el laboratorio como lo hiciste, por querer formarme y conocerme.
- Gracias, Mónica, por tu guía, tu cariño y tu confianza. Porque cuando las palabras faltan sobra sentimiento.

Gracias también al resto, que habéis hecho posible mi trabajo y habéis sido un gran soporte personal. Gracias a todos, por hacerme llevaderos los momentos de desaliento, por aguantar estoicamente mi carácter difícil, mis manías, mi canciones Disney y mi “gran” escala cromática. Por esas risas, copas y locuras juntos. De todos y cada uno me llevo un pedacito y una enseñanza.

- Gracias David, por ser para mí un gran ejemplo. Por mostrarme qué es ser sincero. Por tu cariño y tu respeto.
- Gracias Bea, por abrir una grieta en mi coraza y la mano tendida en Boston.
- Gracias Iciar, por enseñarme a escuchar, nuestras conversaciones de desahogo y ese “gordi” antes de hablar.
- Gracias Roberto, por tu bondad, por tu calma y paciencia infinita, por tu amistad.
- Gracias Ana, por tu trabajo duro, nuestras charlas eternas y tu franqueza.
- Gracias Ali, por tu alegría, gracias Sara, por tu dulzura. Gracias a ambas por preguntar, por el cariño y confianza, y por estar.
- Gracias Mari, por contagiar tu enorme vocación y pasión. Por tu “pim pam pum” y saberte Disney en condiciones.

- Gracias Iván, por tu inteligencia, Alberto, por tu originalidad, y Juan, por poner el contrapunto de sensatez a un grupo genial de locos.
- Gracias Macarena y Tamara, por estar como dos cabras, por hacerme reír siempre y por esos abrazos sinceros.
- Gracias Mayka, por mostrarme a gestionar el tiempo. Por ser profesional en el trabajo y amiga fuera de él.
- Gracias Oli, Jesús, Lidia y Lupe, por vuestra experiencia y madurez, por los consejos. Gracias Juan Guillermo y Víctor, por todos los buenos momentos. Gracias también a un soplo de aire fresco: Isa, Frenan, Juan y Diego.

Por último, quiero agradecer también a mucha gente que me ha mostrado su cariño a lo largo de todos estos años:

- Gracias a Juan Carlos, a María José, a Carmen y a Lola, por pararse en los pasillos. También a Javi, Borja, Karina, Andrea, Jorge, Andrés y Nieves.
- A mis tías Chus y Pirula, por las lecciones de vuestros ejemplos.
- A los López-Rodríguez, por acogerme, tratarme y quererme como a uno más.
- Y por supuesto, gracias a Ariana y mis naveros, por su amistad a pesar de mi silencio. Gracias a Carlos, Ángel y Juanan por encontrarme cuando estaba perdido. Gracias también a “Miguel” y la “River”.

A todos vosotros, GRACIAS.

Y no, no me he olvidado de ti. Y sí, sí me atrevo a hacerlo.

Gracias a ti, Jesús, por aguardar escondido entre sombras, por derribar los muros y vencer mis miedos, por respetar el silencio cuando ya no puedo. Gracias por ser mi fuerza motriz, por todos los planes juntos, por los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 5 |
| RESUMEN | 7 |
| 1. EL ICTUS: FIBRINOLISIS Y TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA..... | 9 |
| 2. EL HIERRO: PAPEL EN LA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 10 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 11 |
| 4. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH | 12 |
| 5. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 14 |
| SUMMARY | 19 |
| 1. STROKE: FIBRINOLYSIS AND HEMORRHAGIC TRANSFORMATION..... | 21 |
| 2. IRON: ROLE IN CEREBRAL ISCHEMIA | 22 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 23 |
| 4. SETTING UP A MODEL OF HT..... | 23 |
| 5. IRON OVERLOAD IN CEREBRAL ISCHEMIA | 26 |
| INTRODUCCIÓN..... | 31 |
| 1. LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR | 33 |
| 1.1. Clasificación de la Enfermedad Cerebrovascular | 33 |
| 1.2. Epidemiología del Ictus | 36 |
| 1.2.1. Factores de riesgo del ictus..... | 36 |
| 1.2.2. Importancia del ictus en la sociedad | 38 |
| 2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR | 41 |
| 2.1. La Penumbra Isquémica Como Concepto Dinámico..... | 42 |
| 2.2. La Cascada Isquémica | 43 |
| 2.2.1. Mecanismos de la muerte por necrosis..... | 44 |
| 2.2.2. Mecanismos de la muerte por apoptosis | 44 |
| 2.2.3. Mecanismos de daño por reperfusión | 46 |
| 2.3. La Respuesta del Tejido a la Isquemia: La Inflamación | 50 |
| 2.3.1. La alteración de la expresión génica..... | 51 |
| 2.3.2. Los receptores Toll-like..... | 52 |

| | |
|---|------------------|
| 2.3.3. La alteración del endotelio y la infiltración..... | 53 |
| 3. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO Y SUS LIMITACIONES | 55 |
| 3.1. El Fracaso de la Neuroprotección..... | 55 |
| 3.2. La Terapia Trombolítica | 57 |
| 3.2.1. El t-PA | 58 |
| 3.2.2. Neurotoxicidad del t-PA en el ictus isquémico | 62 |
| 4. LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA DEL ICTUS ISQUÉMICO | 63 |
| 4.1. La Barrera Hematoencefálica..... | 64 |
| 4.1.1. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica | 65 |
| 4.1.2. Estructura de la barrera hematoencefálica | 66 |
| 4.1.3. Las <i>tight junctions</i> | 67 |
| 4.2. Mecanismos de Transformación Hemorrágica..... | 69 |
| 4.2.1. Disrupción por estrés oxidativo | 69 |
| 4.2.2. Disrupción por neuroinflamación..... | 70 |
| 4.2.3. Disrupción por proteólisis..... | 71 |
| 4.3. La Transformación Hemorrágica en la Isquemia Experimental | 73 |
| 4.3.1. TH en los modelos de oclusión mecánica | 74 |
| 4.3.2. TH en los modelos de oclusión tromboembólica..... | 75 |
| 4.3.3. TH en otros modelos de isquemia | 76 |
| 5. EL HIERRO EN EL ORGANISMO | 77 |
| 5.1. Metabolismo del Hierro | 78 |
| 5.1.1. Absorción intestinal del hierro | 79 |
| 5.1.2. Reciclaje de los glóbulos rojos | 79 |
| 5.1.3. Transporte del hierro en la sangre: la transferrina | 81 |
| 5.1.4. Captación celular del hierro: el receptor de la transferrina | 81 |
| 5.1.5. Almacenamiento del hierro: la ferritina | 82 |
| 5.2. Regulación del Metabolismo del Hierro..... | 83 |
| 5.2.1 Regulación de la transcripción | 83 |
| 5.2.2. Regulación de la traducción: Las IRP y el control de los niveles locales de hierro.. | 84 |
| 5.2.3. Regulación de los niveles sistémicos de hierro: la hepcidina | 86 |
| 5.3. El Hierro en la Isquemia Cerebral | 88 |
| 5.3.1. Metabolismo cerebral del hierro..... | 88 |
| 5.3.2. Papel del hierro en la isquemia cerebral | 89 |
| <u>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> | <u>95</u> |
| 1. JUSTIFICACIÓN..... | 97 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 98 |

| | |
|---|------------|
| 3. OBJETIVOS..... | 98 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 99 |
| 1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO..... | 101 |
| 1.1. Desarrollo de un Modelo de Transformación Hemorrágica | 101 |
| 1.1.1. Establecimiento del modelo..... | 101 |
| 1.1.2. Recanalización con t-PA..... | 102 |
| 1.1.3. Caracterización molecular de la TH..... | 105 |
| 1.2. La Sobrecarga de Hierro en la Isquemia Cerebral | 105 |
| 1.2.1. Cinética de la ferritina sérica y papel del hierro en la isquemia cerebral | 105 |
| 1.2.2. Marcadores sanguíneos de la TH e implicación del hierro en el proceso | 106 |
| 2. TÉCNICAS <i>IN VIVO</i>..... | 107 |
| 2.1. Animales..... | 107 |
| 2.2. Modelo tromboembólico <i>in situ</i> | 108 |
| 2.3. Modelo de la ligadura | 111 |
| 2.4. Extracciones sanguíneas | 111 |
| 2.5. Medida de los parámetros sanguíneos..... | 112 |
| 2.6. Evaluación de los déficits neurológicos..... | 112 |
| 3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES | 114 |
| 3.1. Cálculo del volumen de infarto | 114 |
| 3.2. Cálculo del edema cerebral..... | 115 |
| 3.3. Clasificación macroscópica de la hemorragia | 116 |
| 3.4. Medida del área hemorrágica | 116 |
| 3.5. Espectrofotometría de hemoglobina | 118 |
| 3.6. Observación histológica de la hemorragia | 119 |
| 3.7. Zimografía <i>in situ</i> | 120 |
| 3.8. ELISAs | 121 |
| 3.9. Zimografía | 122 |
| 4.10. Inmunohistoquímica | 122 |
| 4.11. Estadística..... | 125 |
| RESULTADOS | 127 |
| 1. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH..... | 129 |
| 1.1. Establecimiento del Modelo | 129 |
| 1.1.1. Porcentaje de perfusión y volumen de infarto tras la inyección de trombina | 129 |
| 1.2. Recanalización con t-PA..... | 130 |
| 1.2.1. Consideraciones generales: porcentajes de supervivencia y éxito..... | 130 |

| | |
|---|-------------------|
| 1.2.2. Parámetros sanguíneos | 132 |
| 1.2.3. Efecto de la reperfusión con t-PA sobre el daño neuronal..... | 133 |
| 1.2.4. Efecto de la reperfusión con t-PA sobre el daño a la BHE | 133 |
| 1.3. Caracterización Molecular..... | 138 |
| 1.3.1. Efecto sobre el daño neuronal | 138 |
| 1.3.2. Efecto sobre el daño a la BHE | 139 |
| 1.3.3. Efecto del t-PA sobre la actividad gelatinasa..... | 139 |
| 2. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 141 |
| 2.1. Cinética de la Ferritina Sérica | 141 |
| 2.1.1. La ferritina sérica: efecto de la sobrecarga de hierro y de la isquemia cerebral | 141 |
| 2.2. Papel del Hierro en la Isquemia Cerebral | 142 |
| 2.2.1. Parámetros sanguíneos en los animales con sobrecarga de hierro..... | 142 |
| 2.2.2. Efecto de la sobrecarga de hierro sobre el infarto | 142 |
| 2.2.3. Efecto de la reperfusión con t-PA sobre el daño a la BHE | 144 |
| 2.3. Papel del Hierro en la Transformación Hemorrágica | 145 |
| 2.3.1. Consideraciones generales: porcentajes de supervivencia y éxito | 145 |
| 2.3.2. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperfusión sobre el volumen de infarto .. | 148 |
| 2.3.3. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperfusión sobre el daño a la BHE | 148 |
| 2.3.4. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperfusión sobre mediadores de la TH..... | 151 |
| 2.4. Marcadores Sanguíneos de la TH e Implicación del Hierro | 152 |
| 2.4.1. Marcadores explorados..... | 152 |
| 2.4.2. La MMP-9 como marcador de TH | 154 |
| <u>DISCUSIÓN.....</u> | <u>157</u> |
| 1. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH..... | 159 |
| 1.1. Establecimiento del Modelo | 159 |
| 1.2. Desarrollo del Modelo de TH | 160 |
| 1.3. Caracterización Molecular de la TH | 165 |
| 2. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 168 |
| 2.1. Cinética de la Ferritina Sérica | 168 |
| 2.2. Papel del Hierro en la Isquemia Cerebral | 170 |
| 2.3. Papel del Hierro en la TH | 171 |
| 2.4. Marcadores Sanguíneos de la TH..... | 181 |
| <u>CONCLUSIONES.....</u> | <u>185</u> |
| <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | <u>189</u> |

ABREVIATURAS

| | | | |
|------------------|---|----------------|---|
| ADP: | Adenosín difosfato. | HFE: | Proteína de la hemocromatosis hereditaria. |
| AIT: | Ataque isquémico transitorio. | HI: | Infarto hemorrágico. |
| AJ: | <i>Adherens junction.</i> | HIF-1: | Factor inducible por hipoxia-1. |
| ALAs: | Sintasa del ácido δ -aminolevulínico. | HMGB-1: | Proteína de alta movilidad del grupo <i>box</i> -1. |
| AP-1: | Proteína adaptadora 1. | HO-1: | Hemooxigenasa-1. |
| APP: | Proteína precursora del β -amiloide. | HRE: | Elemento de respuesta a hipoxia. |
| ARE: | Elemento de respuesta antioxidante. | HSP: | Proteína de choque térmico. |
| ATLANTIS: | <i>Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in ischemic stroke.</i> | Htc: | Hematocrito. |
| ATP: | Adenosín trifosfato. | ICAM-1: | Molécula de adhesión intercelular-1. |
| BHE: | Barrera hematoencefálica. | Ig: | Inmunoglobulina. |
| DAB: | Diaminobencidina. | IL: | Interleuquina. |
| DALY: | <i>Disability adjusted life years.</i> | IL-1Ra: | Antagonista del receptor de interleuquina-1. |
| DAMPs: | Patrones moleculares asociados a daño. | INE: | Instituto Nacional de Estadística. |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico. | iNOS: | NOS inducible. |
| ECASS: | <i>European cooperative acute stroke study.</i> | IRE: | Proteína reguladora del hierro. |
| EMA: | <i>European Medicines Agency.</i> | IRP: | Elemento regulador del hierro. |
| CCA: | Arteria carótida común. | IV: | Intravenoso. |
| COX: | Ciclooxigenasa. | JAM: | <i>Junction adhesion molecule.</i> |
| DMT-1: | Transportador de metales divalentes-1. | LCR: | Líquido cefalorraquídeo. |
| EAAT: | Transportador de aminoácidos excitadores. | LO: | Lipooxigenasa. |
| EPO: | Eritropoyetina. | LTP: | Potenciación a largo plazo. |
| FDA: | <i>Food and Drug Administration.</i> | MABP: | Presión arterial media. |
| FPN: | Ferroportina. | MCA: | Arteria cerebral media. |
| Hb: | Hemoglobina. | MCAO: | Oclusión de la arteria cerebral media. |
| | | MCP-1: | Proteína quimiotrayente de monocitos-1. |
| | | MDA: | Malondialdehído. |
| | | MEC: | Matriz extracelular. |
| | | MMP: | Metaloproteasa de matriz. |

| | | | |
|-------------------------|---|---------------|---|
| mNSS: | <i>Modified neurological severity score.</i> | RNS: | Especies reactivas de nitrógeno. |
| mRNA: | Ácido ribonucleico mensajero. | ROS: | Especies reactivas de oxígeno. |
| NH: | No hemorrágico. | rPH: | Hemorragia parenquimal remota. |
| NINDS: | <i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke.</i> | SDS: | Dodecil-sulfato-sódico. |
| NMDA: | N-metil-D-aspartato. | SEM: | Error estándar de la media. |
| nNOS: | NOS neuronal. | SIDA: | Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida. |
| NOS: | Óxido nítrico sintasa. | SNC: | Sistema nervioso central. |
| NOX: | NADPH oxidasa. | STAIR: | <i>Stroke Treatment Academic Industry Roundtable.</i> |
| NTBI: | Hierro no unido a transferrina. | Tf: | Transferrina. |
| OMS: | Organización Mundial de la Salud. | TfR: | Receptor de transferrina. |
| PAMP: | Patrones moleculares asociados a patógenos. | TH: | Transformación hemorrágica. |
| PB: | Tampón fosfato. | TIS: | Tromboembólico <i>in situ</i> . |
| PBS: | Tampón fosfato salino. | TJ: | <i>Tight junction.</i> |
| pCO₂: | Presión parcial de CO ₂ . | TLR: | Receptores <i>Toll-like</i> . |
| PFA: | Paraformaldehído. | TOAST: | <i>Trial of org 10172 in acute stroke treatment.</i> |
| PH: | Hemorragia parenquimal. | t-PA: | Activador tisular del plasminógeno. |
| PL: | Fosfolipasa. | TTC: | Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio. |
| pO₂: | Presión parcial de O ₂ . | VEGF: | Factor de crecimiento del endotelio vascular. |
| PTTa: | Tiempo parcial de tromboplastina activada. | ZO: | <i>Zonula occludens.</i> |
| RER: | Retículo endoplásmico rugoso. | | |
| RNA: | Ácido ribonucleico. | | |

A detailed microscopic image of a neural network, showing numerous neurons with dark, star-shaped cell bodies and a dense web of thin, branching processes extending across the field of view. The background is a light, textured gray.

RESUMEN

1. EL ICTUS: FIBRINOLISIS Y TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

El ictus es una enfermedad con una enorme repercusión en el mundo, especialmente en las sociedades occidentales. No sólo es la segunda causa de muerte al provocar más del 10% de las defunciones, sino que es también una importante causa de discapacidad y demencia, lo que genera un gran gasto socio-sanitario. Además, el envejecimiento progresivo de la población y el desarrollo económico de determinadas zonas como el sudeste asiático hace prever un incremento de su incidencia.

Por ello, con el fin de obtener nuevas terapias, el estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al ictus isquémico ha de ser prioritario. Pese a lo exhaustivo de la investigación en este campo, y tras el fracaso de los llamados fármacos neuroprotectores, la recanalización con el activador tisular del plasminógeno (t-PA) continúa siendo el único fármaco aprobado para el tratamiento agudo del ictus isquémico (NINDS, 1995). Sin embargo, su uso es minoritario, estimándose que menos del 5% de los pacientes se benefician de dicha terapia. La principal razón es limitar la aparición de su complicación más temida: la transformación hemorrágica (TH).

Dicho fenómeno se produce por el daño que sufre la barrera hematoencefálica (BHE) durante la isquemia, lo que conduce a la extravasación de sangre al parénquima cerebral; en definitiva, a la transformación de un ictus isquémico en uno hemorrágico. Pese a que la TH forma parte de la evolución natural del infarto cerebral, tanto la recanalización *per se* como el propio t-PA aumentan el riesgo de sufrirla (Larrue et al., 1997; Larrue et al., 2001). Dichas hemorragias, si son extensas, comprometen la vida del paciente, razón por la cual se limita el uso de la terapia trombolítica.

Hoy en día una de las principales líneas de investigación en el campo del ictus es el estudio de los mecanismos de daño a la BHE y, muy especialmente, aquellos potenciados por la recanalización arterial con t-PA que conducen a la TH. Para ello se requieren modelos animales que reproduzcan lo mejor posible lo que ocurre en el humano, permitiendo la reperusión con t-PA y conduciendo al fenómeno de la TH. Sin embargo, la inmensa mayoría de los trabajos experimentales no mencionan la presencia de sangrados e, incluso, muchos afirman explícitamente que no se detectan hemorragias en los animales tras la isquemia. Por lo tanto, existe una clara necesidad de mejorar la traslación de la básica a la clínica con modelos animales, a ser posible lo más parecidos a la clínica, en los que se produzca TH. Precisamente, la primera parte de la presente tesis doctoral consistió en el desarrollo de un modelo de TH mediante fibrinólisis tardía.

2. EL HIERRO: PAPEL EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

El hierro es un elemento vital para el organismo. No sólo es muy abundante en la naturaleza sino que, además, presenta una doble naturaleza rédox. Por ello, la evolución lo ha escogido como el catalizador clave de multitud de procesos íntimamente ligados a la vida como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, la síntesis de DNA o el transporte de oxígeno en la sangre (MacKenzie et al., 2008; Pantopoulos et al., 2012). Paradójicamente, su divalencia también lo hace tóxico para el organismo, ya que su forma reducida es muy reactiva y puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan los componentes celulares. Para evitarlo, este elemento se encuentra muy regulado por el organismo, existiendo mecanismos homeostáticos que controlan sus niveles y su reactividad. Básicamente, el hierro permanece en su forma menos reactiva, la férrica (Fe^{3+}), y secuestrado por sus principales proteínas de unión, la ferritina, que lo almacena, y la transferrina, que lo transporta en la sangre.

Sin embargo, existen evidencias de que estos mecanismos de regulación se pierden en los primeros minutos tras un ictus. El desarrollo del metabolismo anaerobio que ocurre tras la isquemia conduce a una acidosis, la cual media un cambio conformacional en las principales proteínas de unión de este elemento, la ferritina y la transferrina, que lo liberan. Así, se produce un aumento del hierro libre y total de forma muy temprana en el tejido isquémico (Millerot-Serrurot et al., 2008) que, al encontrarse en su forma más reactiva, la ferrosa (Fe^{2+}), contribuye al daño por ROS (para revisión ver (Selim and Ratan, 2004)).

La participación del hierro en el daño isquémico ha sido estudiada desde hace más de 20 años. Por un lado, se ha demostrado que la inyección intracerebral de hierro causa muerte neuronal por estrés oxidativo (Bishop and Robinson, 2001). Por otro, que los quelantes de hierro protegen frente al daño isquémico (Patt et al., 1990; Rosenthal et al., 1992; Soloniuk et al., 1992; Palmer et al., 1994; Yamamoto et al., 1997; van der Worp et al., 1999; Demougeot et al., 2004). Además, en experimentación, niveles bajos de hierro resultan neuroprotectores frente a la isquemia cerebral (Patt et al., 1990) mientras que la sobrecarga de dicho elemento aumenta el daño isquémico (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004).

También existen evidencias clínicas que señalan que los pacientes con mayores niveles de hierro en el organismo, medidos por la ferritina sérica, presentan peor pronóstico tras un ictus y, por lo tanto, el daño isquémico es mayor (Davalos et al.,

1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012). Finalmente, niveles altos de hierro también han sido asociados a peor pronóstico en pacientes que recibieron t-PA y, más notablemente, a un mayor riesgo de TH, principal complicación de la terapia trombolítica (Millan et al., 2007; Choi et al., 2011).

Sin embargo, dichas evidencias clínicas han sido contradichas por, al menos, dos trabajos, uno clínico que no observó la asociación entre mayores niveles de ferritina sérica y peor pronóstico tras un ictus (Christensen et al., 2002) y otro experimental que, empleando dos modelos agudos de sobrecarga, no pudo mostrar un mayor daño isquémico en animales con niveles altos de hierro (Millerot et al., 2005). Estos estudios ponen en entredicho las evidencias sobre el papel deletéreo del hierro destacando que la ferritina sérica, empleada para medir los niveles de hierro en los pacientes, podría dejar de ser un marcador fiable de dichos niveles si aumenta en sangre en las primeras horas tras un ictus (Millerot et al., 2005). En este caso, la ferritina sérica no indicaría depósitos de hierro sino gravedad del ictus. No obstante, varios estudios clínicos han descartado la elevación de la ferritina sérica de forma aguda tras un infarto cerebral (Armengou et al., 1998; Millan et al., 2007; Chakraborty et al., 2012).

Así, la segunda parte de la presente tesis doctoral consistió en el estudio de las acciones de la sobrecarga de hierro en la isquemia cerebral, especialmente en el efecto sobre la BHE que podría agravar la TH, particularmente si la recanalización arterial se retrasase.

3. HIPÓTESIS

Por lo tanto, se trabajó con una doble hipótesis:

En un modelo tromboembólico de isquemia cerebral en ratón, la recanalización arterial temprana con t-PA recupera parte del tejido comprometido mientras que la reperfusión tardía no sólo no mejora el pronóstico, sino que aumenta el riesgo de TH.

Los animales con niveles sistémicos elevados de hierro, al ser sometidos a un ictus experimental, sufren mayor estrés oxidativo y mayor daño isquémico que puede desembocar en TH si se administra t-PA, perdiéndose así el efecto beneficioso de la terapia trombolítica.

4. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los modelos empleados en experimentación animal en el campo del ictus no producen TH, pese a que éste sea un fenómeno observado hasta en el 40% de los pacientes. La literatura acepta que sí puede observarse sangrados en los modelos animales de infarto cerebral, especialmente asociados a la recanalización tardía por t-PA y/o a animales con co-morbididades como obesidad, hipertensión, diabetes o envejecidos. Así, el modelo más usado para el estudio de la TH ha sido clásicamente el modelo tromboembólico, que consiste en la inserción de un coágulo en la carótida externa y, tras llevarlo hasta la carótida común, avanzarlo por la interna hasta el nacimiento de la arteria cerebral media (ACM) en el polígono de Willis. Sin embargo, para producir la TH se requiere la recanalización tardía, más allá de la 3 h tras la inducción del ictus, hecho que se asocia a más de un 40% de mortalidad, lo que hace que este modelo sea poco viable. Descartados otros modelos de isquemia focal como los de oclusión/reperfusión mecánica por no asemejarse a la situación clínica, pocos eran los modelos trombóticos restantes que, mediante la administración tardía de t-PA, pudieran acabar produciendo TH.

Para tal efecto se escogió el modelo tromboembólico *in situ* (TIS), descrito originalmente en 2007 y que consiste en la inyección de trombina en la ACM, en su principal bifurcación, para producir un coágulo e inducir la isquemia (Orset et al., 2007). Orset y colaboradores demostraron que la reperfusión es posible administrando t-PA a los 20 min, hecho que logra disminuir el tamaño de la lesión observada (en comparación con la isquemia permanente) al rescatar parte del tejido comprometido. Además de su gran semejanza con la clínica en este aspecto, al restringirse el infarto al córtex, el modelo presenta una mortalidad casi nula lo que lo convertía en el mejor candidato para trabajar con él.

Así pues, tras establecer la concentración de trombina adecuada para inducir una oclusión estable de la ACM, se procedió a la administración de t-PA a diferentes tiempos de la isquemia, concretamente, a 20 min para comprobar el beneficio de la recanalización temprana, y a 3 para tratar de producir TH. A las 24 h de la isquemia se analizó el beneficio de dichos tiempos de recanalización arterial atendiendo a los parámetros de volumen de infarto, déficits neurológicos, edema cerebral, tipo de sangrado, área y volumen de hemorragia. Finalmente, se realizó un breve estudio de algunas de las moléculas implicadas en la TH administrando t-PA a las 2 h de la oclusión.

Los resultados encontrados muestran que la concentración de trombina necesaria para producir una oclusión estable es de 2UI/ μ l, algo mayor que la descrita en la publicación original, de 0,75UI/ μ l. Además, el tamaño de la lesión se asemeja al publicado en el trabajo original, ocupando exclusivamente el córtex. Aún así, un 15% de los animales recanalizan espontáneamente, por autólisis, hecho también observado por Orset y colaboradores (Orset et al., 2007). Los resultados aquí presentados sí muestran la presencia de sangrados en el grupo MCAO, tratado con vehículo, aunque tanto la medida del área hemorrágica como del volumen de sangre extravasado dan unos valores mínimos, por lo que estas hemorragias son de pequeño tamaño. Probablemente dichos sangrados ocurren porque, a las 24 h, aproximadamente el 85% de los animales considerados como permanentemente ocluidos presentan recanalización arterial allí donde se formó el coágulo. Esta reperfusión espontánea tardía ha sido apoyada por otras publicaciones (Durand et al., 2012) y reproduce otro hecho clínico observado en hasta un 25% de los pacientes (Rha and Saver, 2007).

Por otro lado, la administración de t-PA a los 20 min de la isquemia reduce el volumen de infarto y los déficits neurológicos observados a las 24 h, hecho constatado por Orset y colaboradores y que constituye la base del tratamiento trombolítico (NINDS, 1995; Orset et al., 2007; Hacke et al., 2008). En este caso, también aparecen microsangrados, aunque sólo detectables mediante una tinción de eritrocitos. Sin embargo, la administración tardía de t-PA, a las 3 h, no sólo no disminuye el tamaño de la lesión o los síntomas neurológicos sino que, además, aumenta considerablemente la importancia y magnitud de los sangrados y el edema cerebral, apareciendo hemorragias extensas dentro del tejido infartado (Larrue et al., 1997; Fiorelli et al., 1999; Larrue et al., 2001). Además, otro hecho clínico observado con este modelo y pocas veces descrito en experimentación es que aproximadamente un 45% de los animales tratados con t-PA muestran resistencia a la fibrinólisis y no reperfundan. Así pues, mientras la reperfusión temprana frenaría la progresión del infarto rescatando parte del tejido comprometido, la recanalización tardía podría agravar el daño a la BHE y desembocar en la temida complicación de la TH.

La breve caracterización molecular realizada permitió comprobar que el tratamiento con t-PA a las 2 h de la isquemia es lo suficientemente tardío para no obtener beneficio de dicha terapia e, incluso, para producir sangrados. Además, se comprobó que la actividad gelatinasa resulta notablemente inducida en el tejido isquémico, concretamente en las neuronas y en el endotelio (Amantea et al., 2008) y

que el tratamiento con t-PA a las 2 h aumenta dicha actividad (Fan et al., 2013), presumiblemente debida a las metaloproteasas (MMP) 2 y 9, que han sido implicadas en la apertura bifásica de la BHE (para revisión ver (Jickling et al., 2014)).

La mayor divergencia que presenta este modelo respecto a la clínica es que no reproduce la ventana terapéutica del t-PA, que es de hasta 4,5 h en pacientes. La administración 2 h tras la isquemia es suficiente para no obtener beneficio y observar TH. Diversas razones pueden explicar esta diferencia, principalmente que la eficacia de la recanalización se ha evaluado según los síntomas manifestados a los 3 meses del tratamiento mientras que en experimentación se mide la reducción del volumen de infarto a 24-48 h; que los ictus rara vez ocasionan una depleción total del riego sanguíneo en clínica, sino más bien una reducción por estenosis, mientras en básica la reducción es total por lo que la progresión puede ser más rápida; o, lo más probable, que el metabolismo acelerado de los roedores podría conllevar una mayor susceptibilidad isquémica y un acortamiento de la ventana de beneficio de la reperusión.

Así pues, en su conjunto y pese a algunas limitaciones, el modelo TIS descrito en la presente tesis doctoral presenta grandes ventajas: su alta reproducibilidad, la baja mortalidad y, sobre todo, su enorme semejanza con la clínica. De hecho, es capaz de replicar los beneficios de la recanalización temprana, la TH tras la revascularización tardía, las reperfusiones espontáneas y la resistencia a la fibrinólisis. Así, este modelo quirúrgico es único y de una enorme relevancia ya que podría mejorar la traslación de los resultados obtenidos en experimentación, lo que lo hace el candidato ideal para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos del ictus isquémico, especialmente de aquellos implicados en el daño a la BHE y en la consecuente TH.

5. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Para estudiar el efecto de la sobrecarga de hierro en la TH se realizaron dos conjuntos experimentales. El primero de ellos, tenía como fin la comprobación de las evidencias clínicas y experimentales que asociaban los mayores niveles de hierro a peor evolución tras un ictus, ya que existía controversia en el tema (Millerot et al., 2005), mientras que el segundo bloque trataba de elucidar el posible papel de la sobrecarga de hierro en la TH.

Para el primer bloque se planteó el estudio de la cinética de la ferritina sérica, proteína que había sido empleada en los trabajos clínicos, para determinar si tras un

ictus se alteraban sus niveles o por el contrario seguía siendo un marcador fiable de la concentración de hierro en el organismo y el efecto de la sobrecarga de dicho elemento sobre el volumen de infarto. Para ello se empleó un modelo de oclusión/reperfusión mecánica de la ACM, el de la ligadura distal, por ser mucho más simple y rápido de realizar. Así, tanto animales con niveles normales como con sobrecarga oral de hierro fueron sometidos o a la cirugía (grupo sham), o a la ligadura distal de la ACM tanto de forma permanente como reperfundiendo a 1 o 3 h. Además, también se realizó un segundo grupo de oclusión permanente mediante el modelo TIS. En todos estos grupos se extrajeron muestras sanguíneas a las 0, 3 y 24 h para la determinación de la ferritina sérica y, a las 24 h, se midieron los síntomas neurológicos y se sacrificaron los animales para la medición del volumen de infarto, edema y área hemorrágica.

Los resultados obtenidos muestran claramente que los animales sometidos a la sobrecarga oral de hierro presentan unos niveles elevados de ferritina sérica respecto a los animales con dieta estándar. Además, debido a que la concentración en sangre de dicha proteína no se altera en respuesta a la isquemia en ninguno de los grupos experimentales (ni tras la isquemia ni tras la cirugía), puede concluirse que sigue siendo un marcador fiable de los depósitos de hierro en el organismo incluso tras un infarto cerebral. Así, los trabajos clínicos apuntan a un posible efecto deletéreo de la sobrecarga de hierro en el ictus (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012).

Por otro lado, los datos muestran que el tamaño de la lesión es mayor en los animales con sobrecarga de hierro, pero sólo cuando la isquemia es seguida de una reperfusión temprana. Cuando no hay recanalización (con los dos modelos permanentes diferentes), o ésta es muy tardía, el volumen de infarto no se altera con la sobrecarga de hierro, probablemente porque es máximo. El tamaño final del infarto parece determinado por el estado del tejido isquémico en el momento de la reperfusión. Así, en la isquemia permanente, la penumbra sufre irremediablemente muerte celular, igual que en la reperfusión tardía, donde está muy afectada en el momento de la reperfusión. Cuando la recanalización es temprana gran parte de esta área de penumbra es rescatada (Sobrado et al., 2011), pero no cuando hay sobrecarga de hierro, presumiblemente porque la sobreproducción de ROS mediada por este elemento aumenta el daño isquémico. Por lo tanto, estos datos sugieren que el hierro podría estar jugando un importante papel acelerando la evolución de la penumbra isquémica (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004).

Además, como muestran la mayor área hemorrágica y el mayor edema cerebral encontrados, los animales con sobrecarga de hierro podrían sufrir un daño exacerbado a la BHE, aunque el modelo de ligadura empleado no sea el más adecuado para estos estudios. Estos resultados estarían en consonancia con algunas evidencias clínicas (Millan et al., 2007; Millan et al., 2008; Choi et al., 2011) que han asociado unos mayores niveles de hierro a una mayor probabilidad de TH tras la terapia trombolítica.

Para aclarar el papel del hierro en este proceso se sometió a animales con niveles normales y altos de hierro al modelo de TH anteriormente desarrollado, realizando los siguientes grupos experimentales: sham salino, sham t-PA, MCAO (permanentemente ocluidos) o reperfundidos con t-PA a los 20 min, 1 o 3 h tras la inducción de la isquemia. En todos ellos se realizó un estudio de la recanalización arterial mediante láser-doppler y se tomaron muestras sanguíneas a 0, 3, 6 y 24 h para la determinación de las concentraciones séricas de algunas moléculas, la fibronectina, el malondialdehído (MDA) y las MMPs 2 y 9, y su evaluación como marcadores pronóstico. En el caso de las MMPs también se determinó su actividad mediante zimografía. Además, a las 24h se determinó el volumen de infarto, el edema, el tipo de sangrado, el área hemorrágica, la extravasación de inmunoglobulina G, así como el número de neutrófilos infiltrados y la expresión cerebral de MMP-9 por ser mecanismos implicados en la TH.

Los resultados muestran que los animales con sobrecarga de hierro reperfundan más fácilmente tanto sin tratamiento trombolítico (reperusión espontánea) como con él. Así, queda claramente demostrado que la sobrecarga de hierro induce una recanalización más exitosa y anterior en el tiempo que en el caso de la situación control, hecho absolutamente novedoso en la literatura. De hecho, apenas hay estudios que aclaren los mecanismos por los que el hierro podría estar interviniendo en este proceso, destacando dos trabajos en los que las concentraciones bajas de hierro parecen originar una predisposición a la agregación plaquetaria (Shovlin et al., 2014) o una trombocitosis sanguínea (Evstatiev et al., 2014). Por tanto, cabría esperar que la elevación de los niveles altos de hierro tuviera el efecto contrario: un menor componente plaquetario en los coágulos inducidos por trombina, lo que los haría más susceptibles a la fibrinólisis.

En cuanto al tamaño de la lesión, los resultados muestran que la reperusión temprana (20 min y 1 h después de la isquemia) la disminuye en los animales controles, pero no así en los de sobrecarga de hierro, donde sólo la terapia a los 20 min es eficaz a la hora de reducir el infarto. Esto apoya fuertemente los resultados obtenidos con el

modelo de la ligadura y constituye el trabajo experimental más exhaustivo realizado hasta la fecha sobre el efecto de la sobrecarga de hierro en el ictus.

Más importantes resultan los datos referidos a los sangrados y daño a la BHE. De nuevo se observan pequeñas hemorragias en los animales con isquemia permanente que son aún más escasas cuando se reperfunde a los 20 min y que se exacerban drásticamente cuando se recanaliza a las 3 h, apoyando los resultados obtenidos durante el establecimiento del modelo de TH. Cuando la perfusión tiene lugar 1 h post-isquemia, la sobrecarga de hierro sí que exacerba los sangrados, aumentando tanto la magnitud y el área hemorrágica como el edema respecto al grupo de dieta control. La interpretación de estos datos es que el deterioro de la BHE transcurre de forma simultánea a la muerte del tejido durante la isquemia. Así, el beneficio de la terapia trombolítica sólo se observa si en el momento de la perfusión existe tejido susceptible de ser salvado (t-PA 20 min y 1 h en los animales controles *versus* 20 min en los de sobrecarga de hierro). De lo contrario, la fibrinólisis no sólo no produce beneficio sino que puede exacerbar el daño a la BHE y producir TH (t-PA 3h en controles *versus* 1 y 3 h con sobrecarga de hierro).

En este estudio se analizaron, además, tres de los mecanismos que participan en la TH: el estrés oxidativo, la infiltración de neutrófilos y las MMPs. Pese a no poder cuantificarse el estrés oxidativo sufrido por el tejido cerebral por limitaciones metodológicas, la medida del MDA sérico sí muestra que el estrés oxidativo basal, previo a la isquemia, es mayor cuando los niveles de hierro son altos, lo que podría contribuir al debilitamiento de la BHE antes y durante las primeras horas tras un ictus, especialmente porque el daño parece enfocado al endotelio (Mehta et al., 2004). En cuanto a la infiltración de neutrófilos, parece dispararse en todos los grupos experimentales cuando existe sobrecarga de hierro, presumiblemente por un mayor efecto llamada ante un mayor daño tisular por ROS. Así, estas células podrían estar agravando el daño a la BHE ante los niveles altos de hierro (Rosell et al., 2008). Por último, la expresión de MMP-9 en el tejido, analizada por inmunohistoquímica, no parece inducirse tras la isquemia, ni siquiera con sobrecarga oral de hierro, aunque sí se observa una tendencia a una mayor expresión en los animales que sufrieron TH (t-PA 3h). De nuevo, el análisis de sus niveles séricos no muestra elevación alguna de esta proteína tras la isquemia, pero sí en las primeras horas después de la perfusión por t-PA. Además, la zimografía muestra que la sobrecarga de hierro podría facilitar la activación de esta proteína, probablemente mediante la exacerbación de las ROS (Gu et

al., 2002). Por lo tanto, los tres mecanismos implicados en la TH estudiados podrían estar exacerbados cuando los niveles de hierro en el organismos son altos.

En resumen, este trabajo constituye la primera evidencia experimental de que la sobrecarga de hierro disminuye la ventana de beneficio del t-PA y favorece la TH, hecho que, de confirmarse, tendría unas enormes consecuencias clínicas: la exclusión de este grupo de pacientes del tratamiento fibrinolítico, lo que podría hacer más seguras y maximizar el beneficio obtenido de dichas terapias.

A detailed microscopic image of a neural network, showing numerous neurons with dark, star-shaped cell bodies and a dense web of thin, branching processes extending across the field of view. The background is a light, textured gray.

SUMMARY

1. STROKE: FIBRINOLYSIS AND HEMORRHAGIC TRANSFORMATION

Stroke is a disease with a huge impact in the world, especially in western countries. Being responsible of 10% of the demises, it is not only the second cause of death, but it is also an important cause of disability and dementia, generating an important social-sanitary expense. Besides, the progressive aging of the population and the industrial development of areas like the South-East Asia is leading to an increase in its incidence.

Because of that, with the purpose of getting new therapies, the study of the pathophysiological mechanisms underlying the ischemic insult is imperative. Besides, despite the research in this field and after the failure of the named neuroprotective drugs, recanalization with the tissue type plasminogen activator (t-PA) remains as the only approved drug for the acute treatment of the ischemic stroke (NINDS, 1995). However, its use is limited, being estimated that less of 5% of the patients are receiving this therapy. The main reason is to limit the most feared complication of this treatment: hemorrhagic transformation (HT).

This phenomenon takes place due to the damage that suffers the blood-brain barrier (BBB) during ischemia, which leads, in turns, to the extravasation of blood to the cerebral parenchyma, in short, to the transformation of an ischemic stroke to a hemorrhagic one. TH is part of the natural evolution of ischemic stroke, but some processes like recanalization *per se* and the t-PA side effects increase its risk (Larrue et al., 1997; Larrue et al., 2001). Such hemorrhages, if large, can compromise the life of the patient, reason for which the administration of this therapy has some strong restrictions.

Nowadays, one of the main lines of research in stroke is the study of the mechanisms of damage to the BBB, especially those that are promoted by arterial recanalization with t-PA that lead to HT. For these investigations, animal models that reproduce most accurately as possible what is happening in the human disease are needed, allowing the reperfusion with fibrinolytics that lead to the occurrence of hemorrhages. However, most of the experimental works do not mention bleeding, even some of them explicitly say that hemorrhages are not detected after cerebral ischemia. So, there is a clear need of improving the translation from bench to bedside with better animal models for the study of the HT. Precisely, the first part of this doctoral thesis consisted of the establishment of a model of HT based on late reperfusion with t-PA.

2. IRON: ROLE IN CEREBRAL ISCHEMIA

The iron is an essential element for life. It is not only very abundant in nature, but it also has a double redox valence. Because of that, evolution has chosen it as the key catalyst for a lot of closely linked-to-life processes like photosynthesis, mitochondrial respiration, DNA synthesis or oxygen transport in blood (MacKenzie et al., 2008; Pantopoulos et al., 2012). Paradoxically, this divalence makes iron to be toxic for the organism because its reduced status is very reactive and can generate reactive oxygen species (ROS) which damage cellular substrates. In order to avoid it, this element is regulated by the organism through homeostatic mechanisms that control its levels and reactivity. Basically, iron is kept under its less reactive form, ferric (Fe^{3+}), and chelated by its main binding proteins, ferritin, which stores it, and transferrin, which transport iron in blood.

However, there is evidence showing that these regulatory mechanisms are lost during the first minutes after a stroke. As a consequence of the anaerobic metabolism that takes place after ischemia, ferritin and transferrin, the main iron binding proteins, suffer a conformational change releasing this element to the environment. This produces an increase in total and free iron very early after ischemia in the ischemic tissue (Millerot-Serruot et al., 2008) which remains in its most reactive form, ferrous (Fe^{2+}), and, in this way, can contribute to damage through ROS (for review see (Selim and Ratan, 2004)).

The participation of iron in the ischemic damage has been studied for more than 20 years. On one hand, it has been proved that intracerebral injection of this element causes neuronal death by oxidative stress (Bishop and Robinson, 2001). On the other hand, chelating iron protects against ischemic damage (Patt et al., 1990; Rosenthal et al., 1992; Soloniuk et al., 1992; Palmer et al., 1994; Yamamoto et al., 1997; van der Worp et al., 1999; Demougeot et al., 2004). Besides, experimental works have demonstrated that low systemic levels of iron result in protection after cerebral ischemia (Patt et al., 1990) while iron overload exacerbates the ischemic damage (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004).

There is also some clinical evidence that points out that those patients with higher iron levels in the organism, measured by serum ferritin, have a worse outcome after a stroke (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012). Finally, high iron levels have been also associated to worse

outcome in patients receiving t-PA, more precisely, to a higher risk of HT, the main complication of thrombolytic therapy (Millan et al., 2007; Choi et al., 2011).

However, such evidence has been contradicted by, at least, two works. One of them is a clinical publication that could not find an association between high levels of serum ferritin and worse outcome after stroke (Christensen et al., 2002) and the other is an experimental paper that, working with two different models of iron overload, failed to prove an increased ischemic damage in animals with high iron levels (Millerot et al., 2005). These studies call in question the pieces of evidence about the detrimental role of iron in stroke, highlighting that serum ferritin, used to measure iron stores in patients, could fail to be a reliable marker of these levels if its blood concentration is raised during the first hours after a stroke (Millerot et al., 2005). In this case, serum ferritin would not be any longer a marker of iron stores but of stroke severity. However, some clinical studies have ruled out an increase in serum ferritin during the first hours after the onset of ischemic episode (Armengou et al., 1998; Millan et al., 2007; Chakraborty et al., 2012).

To shed light on these issues, the second part of this doctoral thesis is focused on the study of the effect of iron overload in cerebral ischemia, especially on the effect on the BBB that could lead to HT, particularly if arterial recanalization is delayed.

3. HIPÓTESIS

Therefore, a double hypothesis was formulated:

In a murine thromboembolic model of cerebral ischemia, early recanalization with t-PA recovers part of the compromised tissue while delayed reperfusion not only does not improve the prognosis but also increases the risk of HT.

Animals with high levels of iron, after being submitted to a cerebral ischemia, suffer a higher oxidative stress and a higher ischemic damage that can lead to HT if t-PA is administered, losing the benefits of the thrombolytic therapy.

4. SETTING UP A MODEL OF HT

As it has been mentioned before, most of the stroke models used in animal experimentation do not report HT despite the fact that this phenomenon has been

observed in 40% of the patients. The literature accepts that bleeding can be produced in animal models of cerebral infarction, especially associated to delayed recanalization with t-PA and/or to animals with co-morbidities like obesity, hypertension, diabetes and aging. In this way, the most used model to study the HT has been, classically, the thromboembolic one, based on the insertion of a clot till the birth of the middle cerebral artery (MCA) in the Willis circle. However, delayed recanalization is required to produce HT, a fact associated with mortality beyond 40%, which decreases the utility of this model. Being other focal ischemia models excluded such as those with a mechanic occlusion/reperfusion of the MCA because they do not resemble the clinical situation, only a few thrombotic models were left in which, theoretically, delayed t-PA administration mediated could result in HT.

For the establishment of our model, the *in situ* thromboembolic model (IST) was chosen, from a work originally described in 2007 and which consist in the injection of thrombin in the main bifurcation of the MCA to produce a clot and induce the ischemia (Orset et al., 2007). Orset and collaborators demonstrated that reperfusion can be achieved administrating t-PA 20 min after, a fact that rescues part of the compromised tissue decreasing the size of the lesion (comparing with permanent ischemia). Together with its high similarity with the clinic situation, the model presents a really low mortality due to its cortex-restricted lesion, which makes it the model of choice to work with.

Therefore, after establishing the thrombin concentration needed to induce a stable occlusion of the MCA, t-PA was administered at 20 min and 3 h after ischemia to check the beneficial effect of early reperfusion and to produce HT respectively. Twenty-four h after the occlusion, the effect of arterial recanalization was analyzed attending to the parameters of infarct volume, neurological deficits, cerebral edema, type of bleeding and hemorrhage area and volume. Finally, a brief study of some molecules implicated in the HT was made administering t-PA 2 h after the ischemia.

The results show that the concentration of the thrombin needed to produce a stable occlusion, of 2UI/ μ l, is higher than the one described in the original publication, of 0,75UI/ μ l. Besides, the size of the lesion is also similar, being restricted to the cortex. All the same, 15% of animals spontaneously recanalize by autolysis, an effect also observed by Orset and collaborators (Orset et al., 2007). The analysis of the bleedings showed some hemorrhages in the MCAO, vehicle treated group, but the measurement of the hemorrhagic area as well as the blood volume extravasated yielded minimal values, demonstrating that these are small size bleedings. Probably, this happens because

approximately 85% of the animals considered as permanently occluded presented arterial recanalization at least where the occlusion took place. This delayed spontaneous reperfusion has been supported by some other works (Durand et al., 2012) and reproduce another clinical fact observed in 25% of the patients (Rha and Saver, 2007).

On the other hand, t-PA administration 20 min after ischemia reduced the infarct size and neurological deficits observed at 24 h, an effect validated by Orset and collaborators and that constitutes the basis of the thrombolysis (NINDS, 1995; Orset et al., 2007; Hacke et al., 2008). In this case, there were also some minor bleedings only detectable with a stain for red cells. However, delayed administration of t-PA at 3 h after ischemia, not only did not decrease infarct volume or neurological deficits, but it also considerably increased the magnitude of bleeding and of cerebral edema, showing up large hemorrhages inside the infarcted tissue (Larrue et al., 1997; Fiorelli et al., 1999; Larrue et al., 2001). Besides, another clinical situation observed in this model that has been barely described in experimentation is that approximately 45% of the t-PA treated patients are fibrinolysis resistant and do not reperfuse. Therefore, while early reperfusion stops the progression of the infarct rescuing part of the compromised tissue, delayed recanalization could aggravate the damage to the BBB leading to the feared complication of the HT.

A brief molecular characterization performed allowed to check that t-PA treatment 2 h after ischemia is late enough to lose the benefits from this therapy and even to produce bleeding. Moreover, gelatinase activity resulted strongly induced, in particular in neurons and endothelium (Amantea et al., 2008) and t-PA treatment 2 h after ischemia increased this activity (Fan et al., 2013), presumably due to the methalloproteinases (MMP) 2 and 9 that have been implicated in the biphasic aperture of the BBB (for review see (Jickling et al., 2014)).

The largest difference between this model and the clinical situation is that it does not reproduce the therapeutic window of the t-PA, which is till 4.5 h in patients. Its administration 2 h after cerebral ischemia is enough to lead to a loss of its benefits and subsequent HT. Several reasons could explain this divergence, mainly that the efficacy of the therapy has been evaluated by the neurological deficits observed 4 months after the ischemic episode while in experimentation the reduction of the infarct volume at 24-48 h is used; that, in patients, stroke rarely causes a total depletion of the cerebral blood flow but rather a reduction by stenosis while in basic research the lost of blood perfusion is complete which means that the progression could be faster; or, more

probably, that the accelerated metabolism of the rodents could bring a higher susceptibility to ischemia and a shortening of the window of benefit for reperfusion.

Therefore, all together and despite some limitations, the IST model described in this doctoral thesis presents great advantages, which are its high reproducibility, a low mortality and, above all, its high similarity with the clinical situation. In fact, our model is able to replicate the benefits of the early recanalization, the HT after delayed reperfusion, the spontaneous revascularization and the resistance fibrinolysis. So, this surgical model is unique and highly relevant because of its translational potential, which makes it the ideal candidate for the study of the physiopathological mechanisms of ischemic stroke, especially of those implicated in the BBB damage and HT.

5. IRON OVERLOAD IN CEREBRAL ISCHEMIA

Two different experimental sets were performed in order to study the effect of iron overload in HT. The first of them was designed to confirm the clinical and experimental evidence showing that high iron levels are associated to worse outcome after a stroke, due to the controversy in this issue (Millerot et al., 2005), while the second one tried to determine the possible role of iron overload in HT.

For the first set of experiments, we studied the kinetics of serum ferritin, a protein that had been used in clinical reports, in order to determine whether its levels are modified after stroke or, on the contrary, if it is still a reliable marker of iron concentration in the organism. The second objective was to study the effect of iron overload in infarct volume. For these purposes, the ligature model, a mechanic occlusion/reperfusion of the MCA, was used because it is simply and fast to perform. Thus, animals with iron overload and with normal levels were submitted to the distal ligature of the MCA both permanently and with reperfusion at 1 or 3 h. Moreover, a second type of permanent occlusion was performed using the IST model. In all these experimental groups, blood samples were taken at 0, 3 and 24 h after ischemia for the measurement of serum ferritin, functional outcome was assessed at 24 h and animals were sacrificed at the same time point to determine infarct volume, cerebral edema and hemorrhagic area.

Our results clearly showed that animals with iron overload have higher concentration of serum ferritin than those with standard diet. Besides, because the blood concentration of this protein did not change in response to ischemia in any group

(neither after ischemia nor after surgery), it can be concluded that it remains as a reliable marker of iron stores even after ischemic stroke, confirming those clinical publications that claim a deleterious effect of iron overload on stroke (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012).

On the other hand, our results proved that the lesion size is bigger in animals with iron overload, but only when cerebral ischemia is followed by early reperfusion. When there is no recanalization (using two different permanent models) or this one is delayed, infarct volume is not modified, probably because it is already at a maximum. So, the final size of the lesion seems to be a consequence of the status of the ischemic tissue when reperfusion takes place. Thus, in a permanent ischemia, the penumbra inevitably suffers cell death, as in late reperfusion, in which the tissue is already too affected when the blood flow is restored. However, if recanalization happens very early, a large area of the penumbra is rescued (Sobrado et al., 2011), an effect that we now show to be abolished by iron overload, probably due to the iron-mediated overproduction of ROS that increases the ischemic damage. In conclusion, these data show that iron plays an important role accelerating the evolution of ischemic penumbra to death (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004).

In addition, animals with high levels of iron may suffer an increased damage to the BBB showed by an elevated hemorrhagic area and cerebral edema, despite the fact that this ligature model does not seem to be suitable for this kind of studies. These results are supported by some clinical papers (Millan et al., 2007; Millan et al., 2008; Choi et al., 2011) that have associated elevated iron levels with a higher probability of HT after thrombolytic therapy.

In order to shed light on the role of iron in this process, animals with both normal and high levels of this element were submitted to the model of HT previously described, classified in the following experimental groups: sham saline, sham t-PA, MCAO (permanently occluded) or reperfused with t-PA at 20 min, 1 or 3 h after occlusion. Arterial recanalization was analyzed by laser-doppler flowmetry and blood samples were taken at 0, 3, 6 and 24 h after ischemia for the measurement of serum concentration of molecules implicated in BBB leakage like fibronectin, malondialdehyde (MDA) and MMPs 2 and 9, for its evaluation as prognosis markers. For MMPs, activity was also analyzed by zimography. Besides, 24 h after ischemia, infarct volume, cerebral edema, type of bleeding, hemorrhage area and immunoglobulin extravasation were

examined as well as the number of infiltrated neutrophils and the cerebral expression of MMP-9 as mechanisms involved in HT.

The data obtained showed that animals with iron overload reperfused easily compared with animals with normal levels, indicated by a higher rate of reperfusion without any treatment (spontaneous reperfusion) or with t-PA. Therefore, it is clearly proved that iron overload induces a more successful and time-anticipated recanalization, an effect absolutely original in the literature. Actually, there are only a few papers that can help to elucidate the mechanisms by which iron could be interfering in this process, standing out two works in which low iron concentrations seem to be originating a trend to platelet aggregation (Shovlin et al., 2014) or a thrombocytosis in blood (Evstatiev et al., 2014). Thus, the contrary effect would be expected with high iron levels: a decreased platelet component in the thrombin-induced clots which, in turns, would explain the increased susceptibility to fibrinolysis after t-PA.

About lesion size, the results showed that early reperfusion (20 min and 1 h after ischemia) decreased it in control animals, but not in animals with iron overload, in which only the therapy at 20 min is able to reduce the infarct. This strongly supports the results obtained with the ligature model and constitutes the most extensive study performed up to date about the deleterious effects of iron in stroke.

More interesting are the results of bleeding and BBB damage. Again, small hemorrhages were observed in animals submitted to permanent ischemia which were even minor when reperfusing at 20 min but resulted dramatically exacerbated when recanalizing at 3 h, supporting the conclusions deduced during the setting up of the model. When reperfusion took place 1 h after ischemia, iron overload strengthened bleeding, increasing both magnitude and hemorrhagic area as well as cerebral edema in comparison with control diet group. The explanation for these data is that BBB damage is concomitant to tissue death during ischemia. Thus, the benefit of the thrombolytic therapy is only observed if, when recanalization takes place, there is still tissue susceptible to be rescued (t-PA 20 min and 1 h in control animals *versus* 20 min in iron overload). On the contrary, fibrinolysis not only does not result in benefit but it can also exacerbate the BBB damage and lead to HT (t-PA 3h in controls *versus* 1 and 3 h in iron overload animals).

Besides, in this study three of the mechanisms that have been involved in the HT were analyzed: oxidative stress, neutrophil infiltration and MMP expression. Despite the fact that oxidative stress could not be measured in the cerebral parenchyma due to the

limitations of the method, the measurement of serum MDA did show that basal levels of lipid peroxidation, before ischemia, were higher in iron overload, a fact that could contribute to the weakness of the BBB before and during the first hours after stroke, especially because this damage seems to be focused on the endothelium (Mehta et al., 2004). On the other hand, neutrophil infiltration seems to be increased in all the groups with iron overload, presumably due to a greater chemoattractant effect by ROS. Thus, this cell population could be aggravating the BBB damage when iron levels are increased (Rosell et al., 2008). Finally, MMP-9 expression in the ischemic tissue, analyzed by immunohistochemistry, did not seem to be induced either after ischemia, or after iron overload, but a trend towards an increased expression of this protein was observed in the animals with HT (t-PA 3h). Again, the serum levels of this protein did not raise after ischemia, but they were increased shortly after reperfusion by t-PA. Furthermore, the zimography densitometry showed that iron overload could be facilitating the activation of this protein, an effect probably mediated by ROS (Gu et al., 2002). Therefore, all the three mechanisms of HT studied could be exacerbated when the levels of iron in the organism are elevated.

In conclusion, this work constitutes the first experimental evidence pointing out that iron overload makes the beneficial time window of the t-PA shorter and the HT easier, a fact that, if confirmed, would have enormous clinical consequences: the exclusion of this group of patients from the fibrinolytic treatment, which could make safer and maximize the benefits obtained from these therapies.

The background of the page is a light-colored, marbled paper with a complex, organic pattern of veins and swirls in shades of beige, cream, and light brown. A large, faint, circular watermark is visible in the center of the page, featuring a stylized, possibly heraldic, design that is not clearly defined but appears to be a central element of the paper's texture.

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define **ictus** o **enfermedad cerebrovascular** como "la aparición súbita de trastornos de la función cerebral, con síntomas que duran más de 24 horas, o que llevan a la muerte, sin otra causa aparente que un origen vascular" (Project, 1988). Etimológicamente, la palabra ictus proviene del latín y significa golpe. Otros sinónimos, como accidente cerebrovascular, ataque cerebral o incluso el vocablo inglés *stroke*, hacen referencia a la manifestación brusca y violenta de la enfermedad. También se usa apoplejía, que proviene del griego y significa parálisis, por ser un síntoma muy común.

Un ictus ocurre cuando se produce la disminución brusca del aporte sanguíneo a un área concreta del cerebro, generalmente, bien por la presencia de un coágulo o trombo (ictus isquémico), o bien por la ruptura de un vaso sanguíneo y la consecuente extravasación sanguínea (ictus hemorrágico). Evidentemente, los síntomas que se manifiestan variarán según el área irrigada por el vaso afectado, pudiendo revertirse total o parcialmente si se recupera el flujo de forma temprana. En caso contrario, el cese del aporte sanguíneo desencadena una serie de eventos bioquímicos, conocidos como la cascada isquémica, que llevan a la muerte celular y a la aparición de una zona infartada, que de ser extensa o afectar a áreas clave del cerebro puede comprometer la vida del paciente. Por ello, se emplea también el término **infarto cerebral**, por analogía al de miocardio, aunque asume que se produce muerte celular y por lo tanto no es completamente sinónimo a ictus.

1.1. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La mayoría de los autores clasifican el ictus en isquémico o hemorrágico (Caplan, 2011) y a su vez los sub-clasifican según su etiología (**Figura 1**):

A) ICTUS HEMORRÁGICO: Representa aproximadamente un 14% de los casos y tiene lugar por la ruptura de un vaso y liberación de sangre en el tejido circundante. En este caso, además de darse una isquemia más o menos grave por el cese del aporte sanguíneo tras la ruptura, la sangre liberada ejerce un efecto de masa, cuyas consecuencias sobre las estructuras circundantes se detallaran con posterioridad. No debe confundirse con la transformación hemorrágica (TH) del ictus isquémico, de la cual se hablará más adelante en profundidad. Se sub-clasifica en:

- Hemorragia subaracnoidea: Tiene lugar por la ruptura de un vaso en el espacio subaracnoideo, generalmente un aneurisma en la superficie del cerebro. Representa un 5,4% de los eventos cerebrovasculares.
- Hemorragia intracerebral: Cuando se produce dentro del cerebro, pudiendo ser intraparenquimatosa o intraventricular. Representa un 8,6% de los casos.

B) ICTUS ISQUÉMICO: Se da en un 86% de los eventos cerebrovasculares y es aquel producido por la reducción o bloqueo completo del flujo sanguíneo cerebral. La consecuencia última, si no se restaura la irrigación, es la muerte de las células afectadas. Se distingue **isquemia global**, cuando la totalidad del encéfalo se ve comprometido, e **isquemia focal**, cuando la afectación se restringe a un área.

Algunos autores clasifican el **ataque isquémico transitorio** (AIT) dentro de este grupo por ser una patología cerebrovascular de naturaleza isquémica. Sin embargo, este fenómeno se caracteriza porque los síntomas neurológicos desaparecen antes de las 24 h de evolución, generalmente entre 1-2 h, y no se produce muerte alguna del tejido cerebral. Por ello, según la definición de la OMS, el término ictus no englobaría a los AIT.

El ictus isquémico generalmente se sub-clasifica en:

- De origen extravascular: Producido por compresión vascular debida a otros fenómenos como cánceres, quistes, traumatismos... (isquemia focal).
- De origen vascular: Producido por parada cardíaca, hipotensión grave y mantenida (ambos isquemia global), así como por vasoespasmo, vasculitis o estenosis (isquemia focal).
- De origen intravascular: Es el más habitual y estudiado, produciéndose por la presencia de un coágulo o un émbolo dentro de un vaso (isquemia focal). Existen varias sub-clasificaciones basadas en la etiología, aunque muy semejantes entre ellas (Chen et al., 2012). Lo que varía entre una y otra es la evolución de las técnicas usadas para el diagnóstico, lo que ha llevado a modificar levemente los criterios de clasificación, siendo la más conocida la clasificación TOAST (*trial of org 10172 in acute stroke treatment*). Distingue ictus **aterotrombótico** (10-35%), **cardioembólico** (25-35%), **lacunar** (20-30%), de **causa inusual** (2-5%) y de **causa indeterminada** (15-35%) (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Bejot et al., 2008; Ihle-Hansen et al., 2012) (para revisión ver (Mohr J.P., 2004)).

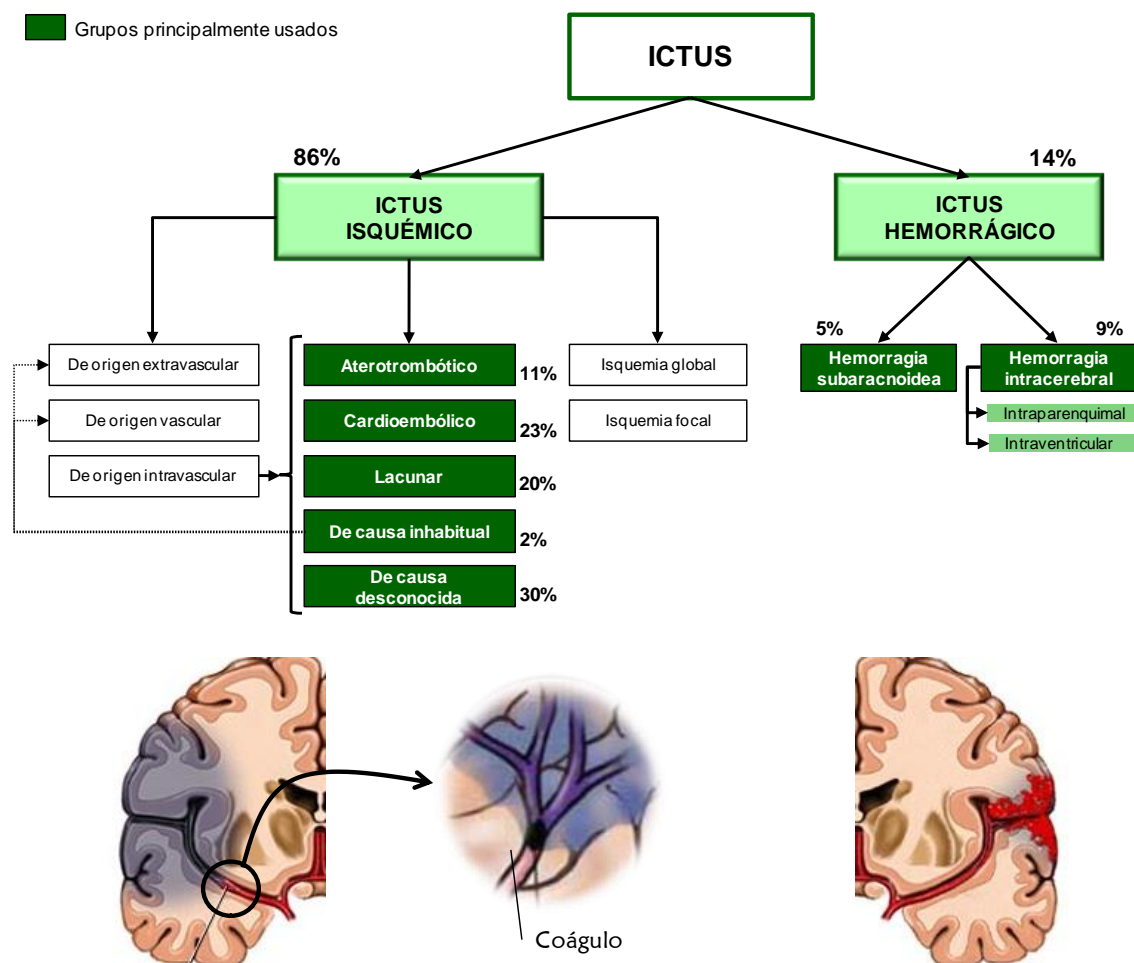


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según el tipo (isquémica o hemorrágica) y subclasificación según el origen de la oclusión, el tipo de isquemia o su etiología (en verde).

- 1) Se considera de etiología aterotrombótica, o de gran vaso, cuando existen placas de ateroma, generalmente en las bifurcaciones de los grandes vasos, que llevan a una estenosis progresiva o que se desprenden y acaban produciendo una falta de riego en territorios más distales. El tamaño del infarto suele ser de grande a mediano. Su incidencia ha bajado en las últimas décadas por el control de sus factores de riesgo (Bejot et al., 2007).
- 2) El ictus cardioembólico tiene lugar cuando un émbolo de origen cardíaco, generalmente producido por fibrilación auricular, llega a una arteria demasiado pequeña para permitir su paso y la ocluye. Se piensa que la mayoría de los AIT se deben a este tipo de oclusión porque es más propenso a reperfusiones espontáneas y a recanalización tras la fibrinólisis (Molina et al., 2004; Fuentes et al., 2012). El lugar de oclusión suele ser semejante al de la etiología aterotrombótica y, por lo tanto, el tamaño del infarto también.

- 3) El infarto lacunar, o de pequeño vaso, tiene lugar cuando se ocluye una de las arterias lenticuloestriatales, que penetran en el encéfalo irrigando generalmente los ganglios basales. Como el propio nombre indica, el tamaño del infarto es pequeño.
- 4) Se considera de causa inhabitual cuando se conoce la causa pero no puede incluirse en ninguno de los tres casos anteriores. Generalmente se incluyen en este grupo todos los ictus de origen extravascular y vascular, principalmente vasculitis.
- 5) Finalmente, un ictus es de etiología indeterminada cuando no se conoce la causa, o bien es multicausal. Muchos de los ictus se clasifican como indeterminados porque no cumplen todos los requisitos exigidos en la clasificación TOAST.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL ICTUS

1.2.1. Factores de riesgo del ictus

El ictus es una enfermedad compleja y heterogénea que atiende a muy diversas causas. Presenta varios **factores de riesgo**, o circunstancias que hacen que las probabilidades de sufrir un ictus aumenten, cuyo conocimiento y control es indispensable para la prevención de la enfermedad cerebrovascular. Precisamente, la prevención ha demostrado ser la mejor estrategia para luchar contra esta enfermedad y paliar sus enormes consecuencias sociales, sanitarias y económicas. Diferentes estudios epidemiológicos tratan de identificar estos factores y de ver su evolución en la sociedad, siendo uno de los más importantes el estudio INTERSTROKE (O'Donnell et al., 2010), que además distingue los factores de riesgo del ictus isquémico y los propios del hemorrágico. Los primeros pueden clasificarse en:

A) NO MODIFICABLES: También llamados incontrolables, son aquellos que, como su propio nombre indica, no pueden ser controlados ni alterados. Su importancia se ve disparada en las sociedades más desarrolladas, puesto que la prevención disminuye el impacto de los modificables. Son:

- Edad: La incidencia del ictus aumenta con la edad. Se dan 50 casos cada 100.000 habitantes entre 35-45 años y 1600 en mayores de 75. Un 95% de los ictus ocurre en mayores de 45 años y dos tercios en mayores de 65 (Allen and Bayraktutan, 2008). Además, la mortalidad también aumenta en los pacientes

de mayor edad. Sin embargo, determinadas etiologías inhabituales pueden ser más frecuentes en pacientes relativamente jóvenes.

- Sexo: En general, los varones tienen mayor riesgo cerebrovascular que las mujeres, concretamente 1,2 veces mayor. Sin embargo, esta relación cambia con la edad. Para los menores de 75 años, la incidencia es 1,5 veces mayor en varones que en mujeres, pero para mayores de 85 años la tendencia se invierte, siendo 1,3 veces mayor para las mujeres (Rosamond et al., 2008).
- Raza: Los afroamericanos y los nativos americanos tienen el doble de riesgo cerebrovascular que los individuos de raza blanca. Para los hispanos el riesgo es algo mayor que para los blancos, mientras que los asiáticos presentan una incidencia ligeramente menor (Rosamond et al., 2008; Go et al., 2013; Go et al., 2014).

B) MODIFICABLES: También llamados controlables porque son aquellos sobre los que se puede actuar y controlar con un tratamiento médico adecuado. Muchos de ellos son también factores de riesgo de la isquemia cardiaca y muchos tienen que ver con el estilo de vida del paciente. Los principales son:

- Hipertensión: Se ha asociado una presión arterial elevada tanto a un mayor riesgo de ictus isquémico como hemorrágico. Una presión sistólica mayor de 160 mm Hg multiplica por 3 el riesgo de ictus y se calcula que casi en un 80% de los que sufren un episodio cerebrovascular la tienen por encima de 140 mm Hg. Además, el control farmacológico de la tensión ha demostrado disminuir el riesgo de ictus (Cushman et al., 2010).
- Fibrilación auricular: Esta alteración del ritmo del corazón es la principal causa del ictus cardioembólico e incrementa 5 veces el riesgo. La fibrilación auricular aparece con la edad, siendo en parte responsable del aumento de la incidencia del ictus en este grupo de personas. Además, debido a que es asintomática, su importancia en el ictus puede estar subestimada.
- Diabetes mellitus: Las personas que sufren esta alteración del metabolismo de la glucosa tienen el doble de riesgo de padecer un ictus. Además, el tamaño del infarto parece ser mayor, así como la probabilidad de desarrollar TH.
- Factores psicosociales: Tanto el estrés como la depresión han mostrado aumentar aproximadamente un 30% las posibilidades de sufrir un ictus.
- Obesidad, dieta, tabaco, alcohol e inactividad física: Estos factores tienen que ver con el estilo de vida del paciente. La obesidad, medida mediante el índice

cintura-cadera, así como la dieta rica en grasa aumentan entre un 20-60% el riesgo de ictus. El tabaco lo duplica, siendo además consumo dependiente. A pequeñas dosis el alcohol parece prevenir, pero a dosis más elevadas aumenta un 50% la probabilidad de sufrir un episodio cerebrovascular. Por último, el sedentarismo aumenta el riesgo un 50%.

1.2.2. Importancia del ictus en la sociedad

El ictus se agrupa dentro de las enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen, según la OMS, la primera causa de muerte en el mundo. Aproximadamente un 35% de las defunciones ocurridas en el mundo en el 2011 fueron causadas por este grupo de enfermedades (Lozano et al., 2012), aunque existen claras diferencias entre países (datos de la OMS, 2011 (www.who.int/es/)). En los más pobres, algo más del 15% de las muertes se produce por enfermedades cardiovasculares, siendo las infecciosas las responsables de más de un tercio de las defunciones. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, las enfermedades cardiovasculares representan entre un 30-45% de las causas de muerte. Curiosamente, en los países más ricos el porcentaje desciende de nuevo a un 35% (**Tabla 1**). En 2012 en España, estas enfermedades ocasionaron un 30,3% de las defunciones, siendo casi alcanzadas por los tumores (27,5%) (datos del Instituto Nacional de Estadística, (INE, www.ine.es)).

Si hablamos del ictus propiamente dicho, éste es la **segunda causa de muerte en el mundo**, representando un 11% de los fallecimientos y siendo sólo superado por la isquemia cardiaca con un 13% (Lozano et al., 2012). Según la OMS, de nuevo existen diferencias notables entre países (www.who.int/es/): la enfermedad cerebrovascular provoca un 6% de los fallecimientos en los países más pobres, en donde es superada por causas como la diarrea, el SIDA, la malaria, o la muerte perinatal (**Tabla 1**). Sin embargo, en países en vías de desarrollo, el ictus ocasiona cerca de un 13% de las defunciones, mientras que en los países más ricos el porcentaje desciende hasta el 9%.

El mayor número de fallecimiento por ictus ocurre, por lo tanto, en los países llamados en vías de desarrollo, siendo la primera causa de muerte en países del sudeste asiático como Indonesia, Tailandia o Vietnam (Hoy et al., 2012). Esto ocurre porque el desarrollo implica un aumento en la esperanza de vida, incrementándose los factores de riesgo de la enfermedad cerebrovascular. Sin embargo, como países emergentes, la pobreza, el mal acceso a la sanidad y el pobre conocimiento de la enfermedad por la población hace que la mortalidad se dispare (Elkind, 2011).

Tabla 1. Principales causas de muerte en el mundo según la riqueza del país.

| | Mundial | Alto | Medio | Bajo | Muy bajo |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Infecciones respiratorias | 6,2% | 3,9% | 3,9% | 5,9% | 11,5% |
| Enfermedades infecciosas | 15,3% | 2,1% | 8,8% | 15,3% | 33,9% |
| Diarrea | 4,3% | 0,2% | 0,9% | 5,2% | 8,2% |
| SIDA | 3,1% | 0,2% | 4,8% | 2,1% | 7,8% |
| Tuberculosis | 2,4% | 0,2% | 1,0% | 2,8% | 4,3% |
| Cáncer | 13,3% | 26,5% | 14,4% | 11,7% | 5,0% |
| Cáncer de pulmón | 2,4% | 5,9% | 2,2% | 2,1% | 0,5% |
| Enfermedades cardiovasculares | 30,5% | 36,5% | 42,0% | 30,2% | 15,8% |
| Isquemia cardiaca | 12,8% | 15,6% | 19,1% | 12,3% | 6,1% |
| Cerebrovasculares | 10,8% | 8,7% | 13,1% | 12,7% | 4,9% |
| Hipertensión | 2,0% | 2,3% | 2,8% | 2,0% | 1,3% |
| Causas externas | 9,0% | 6,2% | 10,4% | 9,5% | 9,1% |
| No intencionada (accidentes) | 6,4% | 4,2% | 6,8% | 6,8% | 6,5% |
| Intencionada (suicidio y violencia) | 2,7% | 1,9% | 3,5% | 2,6% | 2,7% |
| Enfermedades respiratorias | 7,4% | 5,8% | 4,4% | 9,8% | 3,7% |
| Enfermedades del sistema digestivo | 3,9% | 4,3% | 4,6% | 4,0% | 2,6% |
| Diabetes | 2,2% | 2,6% | 3,2% | 2,0% | 1,6% |
| Postparto y perinatal | 5,2% | 0,4% | 2,2% | 5,8% | 10,4% |

Sólo aparecen aquellas causas mayores al 2,0% de las defunciones.

Adaptado de la OMS, www.who.int/es/.

Por el contrario, en los países más desarrollados, en donde la esperanza de vida es aún mayor, la incidencia del ictus ha disminuido ligeramente, en parte, gracias al control de los factores de riesgo (Carandang et al., 2006). Además, un buen acceso a la sanidad, junto con un mejor tratamiento de la enfermedad y conocimiento por parte de la población, hace que disminuya la mortalidad (Carandang et al., 2006; Norrving and Kissela, 2013). Así, en Norteamérica, Europa Occidental y del Norte, Japón y Australia la mortalidad por ictus es claramente menor que en Europa del Este, Sudamérica y el Sudeste Asiático.

En España, el ictus es actualmente la segunda causa de muerte tras las enfermedades isquémicas cardíacas, ocasionando un 7,3% de las defunciones. En mujeres constituye la primera causa de muerte (aunque la suma de las demencias y de la enfermedad de Alzheimer lo superaría), mientras que en varones es la cuarta (**Tabla 2**), superado de nuevo por la isquemia cardiaca, por el cáncer de pulmón y por las enfermedades crónicas de las vías respiratorias (datos del INE, 2012, www.ine.es).

Tabla 2. Principales causas de muerte en España según el sexo.

| VARONES | Porcentaje | MUJERES | Porcentaje |
|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Isquémicas del corazón | 10,0% | Cerebrovasculares | 8,9% |
| Cáncer de pulmón | 8,7% | Isquémicas del corazón | 7,9% |
| Cerebrovasculares | 6,1% | Insuficiencia cardíaca | 5,9% |
| Crónicas respiratorias | 5,9% | Demencia | 5,2% |
| Cáncer de colon | 3,3% | Alzheimer | 4,5% |

Adaptado del INE, 2011, www.ine.es.

Tanto por el mejor control de los factores de riesgo como por el mejor tratamiento tras un ictus, la mortalidad por esta enfermedad ha caído de forma drástica en los últimos 10 años en los países occidentales (Feigin et al., 2014). Además, el buen conocimiento de los síntomas del ictus por la población adulta hace que el paciente se presente antes en el hospital (Lundelin et al., 2012). Así, en la última década en nuestro país, el ictus ha pasando de ocasionar un 10,2% de las defunciones a un 7,3% (**Tabla 3**) (datos del INE, 2001-2012, www.ine.es) siendo, junto a Francia e Italia, uno de los porcentajes más bajos del mundo occidental, incluso pese a que dichos países mediterráneos tienen la mayor esperanza de vida del mundo junto a Japón. De forma semejante a lo registrado en España, en EE.UU. la mortalidad por ictus ha caído un 40% en los últimos 25 años.

Tabla 3. Evolución de las principales causas de muerte en España en los últimos 10 años.

| | 2011 | 2009 | 2007 | 2005 | 2003 | 2001 |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Isquémicas del corazón | 9,0% | 9,3% | 9,7% | 10,1% | 10,5% | 10,8% |
| Cerebrovasculares | 7,4% | 8,1% | 8,6% | 9,0% | 9,7% | 10,2% |
| Cáncer de pulmón | 5,4% | 5,3% | 5,2% | 4,9% | 4,9% | 5,1% |
| Insuficiencia cardíaca | 4,4% | 4,6% | 5,2% | 5,1% | 5,2% | 5,2% |
| Crónicas respiratorias | 4,1% | 4,1% | 3,9% | 4,3% | 4,2% | 4,0% |
| Demencia | 3,8% | 3,6% | 3,0% | 3,0% | 3,2% | 3,0% |
| Alzheimer | 3,1% | 2,9% | 2,6% | 2,3% | 2,2% | 1,7% |
| Cáncer de colon | 3,0% | 2,8% | 2,7% | 2,5% | 2,5% | 2,5% |
| Diabetes mellitus | 2,6% | 2,6% | 2,6% | 2,7% | 2,6% | 2,7% |
| Hipertensión | 2,5% | 2,1% | 1,9% | 1,7% | 1,6% | 1,5% |

Adaptado de los datos del INE, 2001-2012, www.ine.es.

Sólo aparecen aquellas causas con peso mayor a 2,5% de las muertes.

En azul aquellas causas que tienden a disminuir, en rojo las que aumentan.

Sin embargo, el verdadero impacto del ictus no debe valorarse sólo en términos de incidencia o mortalidad. De hecho, esta enfermedad suele ser más discapacitante que letal, llegándose a estimar que aproximadamente un 70% de los pacientes sobrevive a un ictus. En EE.UU., la mortalidad en el primer año tras un ictus isquémico es tan solo del 10% mientras que, en el caso de los hemorrágicos, es algo mayor del 45% (Rosamond et al., 2008). Los pacientes que sobreviven a un infarto cerebral suelen presentar una serie de secuelas limitantes y devastadoras para la vida del paciente y su familia, lo que le confiere una mayor importancia socio-sanitaria. A los 6 meses un 50% de los pacientes presenta hemiparesia, un 20% afasia y entre 25-30% algún grado de dependencia (Kelly-Hayes et al., 2003). Por ello, el ictus no sólo es la 2ª o 3ª causa de muerte en los países occidentales sino que, además, constituye la primera **causa de discapacidad** en mayores de 65 años (Sousa et al., 2009) y la tercera de años perdidos por discapacidad (Murray et al., 2012). También es la segunda **causa de demencia** en mayores de 65 años, secuela que se presenta en un 25% de los sujetos a los 3 meses del ictus, aunque existe deterioro cognitivo en un porcentaje mucho mayor (Go et al., 2013). Además, un 35% presenta **depresión mayor** (Rosamond et al., 2008).

Todo esto hace que la calidad de vida del paciente disminuya mucho y genere un **gasto socio-sanitario muy grande**. Se ha estimado que, en la Unión Europea, los costes directos e indirectos ascendieron a 21 mil millones de euros en el año 2003 (Leal et al., 2006).

2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

El cerebro es el órgano que más oxígeno y glucosa demanda, consumiendo aproximadamente un 20% del total del organismo pese a que representa sólo el 2% del peso. Además, las células cerebrales obtienen toda la energía del metabolismo de la glucosa, pero su capacidad para almacenar esta molécula es muy limitada. Por ello, es el órgano que más depende de un correcto aporte sanguíneo y el más sensible a la isquemia. Sin una perfusión adecuada, el cerebro sólo puede cubrir sus requerimientos energéticos durante poco tiempo, no sólo por la dependencia de glucosa para obtener energía, sino también por la escasa capacidad para almacenarla que tiene (Kristian, 2004). Por ello, la perfusión queda muy regulada según la actividad metabólica y funcional en cada área cerebral.

2.1. LA PENUMBRA ISQUÉMICA COMO CONCEPTO DINÁMICO

Tras una isquemia cerebral focal, el tejido isquémico va a sufrir diferentes grados de reducción del flujo sanguíneo (Astrup et al., 1977) dependiendo, básicamente, de la irrigación por vasos colaterales. Podemos definir **core** o **núcleo isquémico** como el territorio en donde se produce un mayor grado de isquemia al estar irrigado exclusivamente por el vaso obstruido (disminución $> 10\%$ del flujo basal). En esta área las células morirán por **necrosis** prácticamente de manera inmediata (5-10 min tras la interrupción del flujo sanguíneo). Rodeando esta zona de infarto existe otra, denominada **penumbra isquémica**, en donde el flujo sanguíneo se ve reducido parcialmente al quedar irrigada por vasos colaterales. La perfusión remanente, entre un 10-30% del basal, es suficiente para mantener la viabilidad celular por un tiempo determinado, que dependerá del grado de hipoperfusión, pero no para permitir su función normal (Astrup et al., 1981). Esta área de penumbra es susceptible de recuperación si se restaura el flujo sanguíneo y se corrigen las alteraciones bioquímicas producidas como consecuencia de la isquemia. De lo contrario, la penumbra isquémica también sufrirá muerte celular pero, en este caso, por **apoptosis**. Finalmente, queda una **zona oligohémica** que rodea a la penumbra, que tiene un flujo sanguíneo claramente menor (entre un 30-50% del basal), pero que no llega a comprometer la viabilidad y hasta donde la muerte celular no progresará, salvo en circunstancias especialmente adversas (para revisión ver (Ginsberg and Pulsinelli, 1994; Hossmann, 1994; Baron, 2001)).

Sin embargo, la distinción entre *core* y penumbra no es tan sencilla. Muchos ictus ocurren por estenosis parcial, por lo que la reducción del flujo sanguíneo puede no ser total y, por lo tanto, carecerían de *core* según la definición anterior. Además, la isquemia afecta a todos los tipos celulares de la **unidad neurovascular** y, debido a que no son igual de susceptibles, tanto apoptosis como necrosis, e incluso formas intermedias de muerte, ocurren de manera simultánea en el tejido isquémico. Por ello, a efectos prácticos, se considera *core* aquel territorio insalvable en donde ya se está produciendo la muerte celular y penumbra el área susceptible aún de ser salvada (Fisher and Albers, 2013).

Si bien cabría pensar que la penumbra no evolucionará a *core* si se restaura el flujo sanguíneo cerebral, se ha comprobado que, cuando el proceso de muerte celular ha alcanzado un determinado punto, la reperusión no solo no frena la progresión sino que puede potenciar los mediadores de la cascada isquémica, facilitando la progresión de la

zona de penumbra hacia la muerte celular. Es lo que se ha venido llamando como **daño por reperusión**.

Estos tres mecanismos, la muerte necrótica, la apoptosis y el daño por reperusión serán los mecanismos que se expliquen a continuación.

2.2. LA CASCADA ISQUÉMICA

Durante una isquemia cerebral, el aporte sanguíneo se ve comprometido, por lo que el tejido afectado sufre una serie de alteraciones moleculares que, de no recuperarse la irrigación cerebral, conducen irremediablemente a la muerte celular (**Figura 2**). Estas alteraciones bioquímicas se conocen como la **cascada isquémica**, porque se producen de manera secuencial en el tiempo, dando paso un proceso al siguiente, aunque no necesariamente de manera ordenada o rígida (para revisión ver (Siesjo, 1992; Brouns and De Deyn, 2009; Kalogeris et al., 2012)).

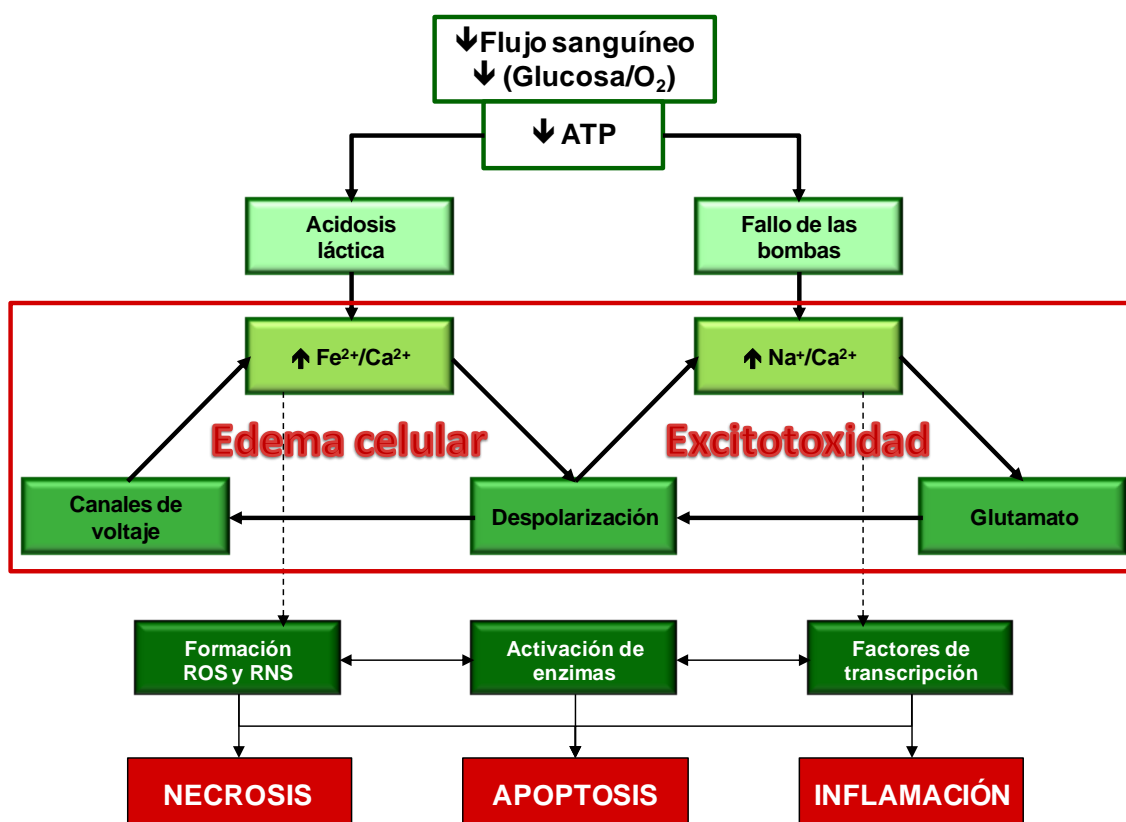


Figura 2. La cascada isquémica. Principales eventos moleculares y celulares desencadenados por la isquemia y que llevan a la muerte celular.

En las últimas décadas se ha producido un avance espectacular en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que llevan a la muerte del tejido isquémico, a lo que han contribuido enormemente los estudios **neuroprotectores** que, a través de fármacos bloqueantes de las diversas vías lesivas, tienen como fin frenar la progresión del daño isquémico. Pese a probar su éxito en modelos experimentales, ninguno de estos agentes ha mostrado eficacia en la clínica hasta la fecha (para revisión ver (Cheng et al., 2004; O'Collins et al., 2006; Sacco et al., 2007; Ginsberg, 2009)). En cualquier caso, parece indispensable avanzar en el conocimiento de la cascada isquémica para dilucidar los mecanismos disparados por la isquemia y para la potencial modulación de las vías alteradas en este proceso.

2.2.1. Mecanismos de la muerte por necrosis

En primera instancia, la alteración del aporte de oxígeno y nutrientes va a ocasionar una **depleción de adenosín trifosfato (ATP)**. Al no estar presente el O_2 , que es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, ésta no funciona correctamente. Como consecuencia, los complejos mitocondriales pierden la capacidad de bombear H^+ al espacio intermembrana, disipándose de forma inmediata el gradiente de protones y desapareciendo la capacidad de la mitocondria para formar ATP.

En el *core* isquémico, donde esta carencia energética es prácticamente total, las ATPasas, que mantienen los gradientes iónicos y por lo tanto el potencial de membrana, dejan de funcionar. Se produce así la despolarización de las células que ocasiona la apertura de los canales regulados por voltaje. Se produce una salida de K^+ y una entrada masiva de Na^+ y Ca^{2+} (Astrup et al., 1977). Este desequilibrio osmótico induce el paso de agua al citoplasma y orgánulos, provocando un **edema citotóxico** que lleva a la muerte celular por necrosis, rompiéndose las células dañadas y liberando su contenido al parénquima (Siesjo, 1992).

2.2.2. Mecanismos de la muerte por apoptosis

En la zona de penumbra, el déficit de energía es menor, lo que ocasiona cierta resistencia a la isquemia, principalmente debido a que las ATPasas de Na^+/K^+ aún mantienen cierta capacidad de funcionamiento. Sin embargo, también en esta área van a producirse alteraciones bioquímicas que van a ir encadenándose y que pueden llevar a la muerte celular y a la evolución de la penumbra a *core*.

El flujo remanente aporta la glucosa necesaria para que se produzca formación de ATP por la vía anaerobia. Como consecuencia, se produce un exceso de ácido láctico y una **acidosis**. Ésta puede inhibir la fosforilación oxidativa y agravar aún más la depleción energética. También contribuye a la lesión endotelial, altera el equilibrio iónico y favorece el edema celular (Hillered et al., 1985). Además, determinadas proteínas que secuestran Ca^{2+} y Fe^{3+} cambian de conformación en ambientes ácidos, liberando dichos iones al citoplasma (Siesjo, 1988; Lipscomb et al., 1998).

Igualmente, desde etapas muy precoces, la despolarización de las neuronas más afectadas por la isquemia y la entrada de Ca^{2+} inducen la liberación de glutamato al espacio extracelular (Katchman and Hershkowitz, 1993), al que se une el liberado por la reversión de los transportadores gliales y neuronales dependientes de ATP (transportadores de aminoácidos excitadores, EAAT (Rossi et al., 2000)). Este glutamato interacciona con sus receptores ionotrópicos tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionico) y los activa, permitiendo la entrada masiva de Na^+ y agravando la despolarización celular. Esta despolarización provoca a su vez la extrusión de Mg^{2+} de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), lo que posibilita ahora su activación por glutamato. La estimulación de estos últimos conduce a un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que expande la liberación de aminoácidos excitadores, proceso conocido como **excitotoxicidad por glutamato** (Meldrum et al., 1985). En la isquemia también se produce la liberación masiva de otros neurotransmisores, entre ellos la glicina, que es un coactivador de los receptores NMDA.

El Ca^{2+} que entra a la célula por los receptores NMDA activados se une al que entró por la apertura de los canales regulados por voltaje y al que se libera de sus proteínas de unión por la acidosis, provocando así un **aumento del Ca^{2+} intracelular libre** (Choi, 1988). Este ión activa determinadas enzimas como las fosfolipasas (PLs) que quedan implicadas en la formación de mediadores inflamatorios (PLA_2 , al contribuir al metabolismo de ácidos grasos como el ácido araquidónico (Bazan, 1989)). Además, dentro de este grupo de enzimas se encuentra la PLC que, al formar inositol trifosfato (IP_3) y activar unos canales del retículo endoplásmico rugoso (RER), activa la liberación masiva de más Ca^{2+} . Un aumento excesivo de Ca^{2+} tendrá consecuencias fatales para el porvenir de la célula ya que dificulta aún más el mantenimiento del potencial de reposo, contribuye al edema celular y, ante niveles excesivamente altos, inducirá la muerte necrótica en la célula. Dicho ión también constituye un segundo mensajero de muchas vías por lo que, cuando los niveles están algo menos elevados, regula la expresión de

múltiples genes proinflamatorios, activa enzimas de lisis (proteasas, fosfolipasas ya mencionadas, endonucleasas...) y proinflamatorias (las óxido nítrico sintasas (NOS) Ca^{2+} dependientes), y promueve la vía intrínseca de la apoptosis al acumularse en la mitocondria (Choi, 1988).

Por su parte, el Fe^{3+} , ahora Fe^{2+} , intervendrá en la formación de **especies reactivas de oxígeno (ROS)** y **de nitrógeno (RNS)** y su papel en la isquemia cerebral se detallará posteriormente por su importancia en este trabajo (para revisión ver (Olmez and Ozyurt, 2012). Básicamente, durante la isquemia se produce una sobreproducción de estos radicales libres que excede la capacidad antioxidante de la célula. Dichos radicales son principalmente el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el mayoritario y formado por el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial durante la isquemia, exacerbado en la reperusión; el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), considerado uno de los más reactivos y formado por el Fe^{2+} libre en la reacción de Haber-Weiss (Lipscomb et al., 1998); el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), formado por la superóxido dismutasa y otras enzimas, que transforma el $\text{O}_2^{\cdot-}$ en esta molécula oxidante; el óxido nítrico (NO^{\cdot}), gas difusible y muy reactivo que en condiciones normales actúa como mensajero neuronal y como vasodilatador (Moncada and Higgs, 1993) y que en isquemia se sobreproduce, alcanzando niveles tóxicos, por la sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y porque la entrada de Ca^{2+} activa la isoforma neuronal (nNOS); y el peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), que se produce al reaccionar el superóxido con el óxido nítrico y es uno de los más dañinos (para revisión ver (Moro et al., 2005). Estas ROS y RNS contribuirán a la muerte celular, dañando proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, principalmente de la membrana mitocondrial, comprometiendo aún más la formación de ATP y llevando a la destrucción celular.

Todas estas vías de la cascada isquémica llevan a la muerte celular y a la progresión de la penumbra durante las 6-8 primeras horas tras la isquemia. Sin embargo, también hasta 2-3 días después puede producirse muerte celular mediada por la inflamación y la alteración de la microvasculatura cerebral (Heiss, 2012).

2.2.3. Mecanismos de daño por reperusión

Resulta lógico pensar que si la interrupción del flujo sanguíneo cerebral activa vías que conducen a la muerte celular, la restauración de dicha irrigación restablecerá las condiciones en el tejido afectado y contribuirá a reducir el daño isquémico. Si bien esto es cierto, puesto que la reperusión temprana es el único tratamiento para el ictus

(NINDS, 1995), también lo es que la reoxigenación del tejido puede potenciar el daño celular (para revisión ver (Sanderson et al., 2013)). Esto se observó por vez primera hace más de 50 años en isquemia cardíaca, viéndose que la reperfusión parecía acelerar la necrosis de la zona infartada (Jennings et al., 1960). Dicho fenómeno se denominó daño por reperfusión y agrupa aquellos mecanismos que no se dispararon durante el periodo isquémico precedente y que, tras la restauración del flujo sanguíneo, llevan a la muerte celular del tejido comprometido. Básicamente, durante la isquemia, las células tratan de adaptarse a la limitada disponibilidad de oxígeno alterando el funcionamiento de las mitocondrias. Cuando se restaura la circulación cerebral, se produce un exceso de disponibilidad de oxígeno, que va a reaccionar formando ROS y RNS. Hay que aclarar que si bien estos procesos aceleran el daño celular al producirse la reoxigenación, no contribuyen a extender la lesión a zonas no isquémicas, afectando sólo al tejido comprometido que, de no producirse la reperfusión, moriría por otros mecanismos.

En condiciones normales, la mitocondria presenta en su membrana interna una serie de complejos proteicos que forman una cadena transportadora de electrones. Por orden son, el complejo I, el II, la ubiquinona, el complejo III, el citocromo c y el complejo IV. Los complejos I y II toman electrones del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y del FADH_2 respectivamente, moléculas formadas en el ciclo de Krebs, siendo transferidos por orden al resto de complejos mitocondriales y finalmente al O_2 para formar H_2O . Durante el transporte electrónico varios complejos bombean H^+ al espacio intermembrana (I, III y IV). De esta manera se genera un gradiente electroquímico que será utilizado por el complejo V o ATP sintasa para acoplar la entrada de protones a la síntesis de ATP (Figura 3A).

La transferencia electrónica es un proceso altamente eficaz. Apenas se producen fugas, pero un pequeño porcentaje de electrones escapa antes de llegar al complejo IV (a través de los complejos I y III) y reacciona con O_2 para generar el radical O_2^- . Sin embargo, las defensas antioxidantes de la célula son suficientes para contrarrestar los efectos de estas ROS en condiciones normales. Además, este proceso se encuentra muy finamente regulado para adaptar las necesidades energéticas de la célula a la formación de ATP. Los mecanismos reguladores son los siguientes:

- Control respiratorio: Es un mecanismo por el cual los complejos mitocondriales no bombean protones cuando el gradiente electroquímico supera un umbral determinado. Cuando la ATP sintasa funciona, se reduce el gradiente de protones permitiendo de nuevo que los complejos bombeen H^+ al espacio

intermembrana (Chance and Williams, 1955). De esta manera, el potencial de membrana se mantiene entre 80-140 mV, rango en el que la formación de ROS es mínima y la de ATP es máxima (Sanderson et al., 2013).

- Control alostérico: El ATP y el adenosín difosfato (ADP) son moduladores del complejo IV (el ATP lo inhibe y el ADP lo activa), lo que ajusta el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial a las necesidades metabólicas (Arnold and Kadenbach, 1999).
- Fosforilación de los complejos: Se produce sobre los dos últimos elementos de la cadena mitocondrial (Lee et al., 2006). En condiciones normales el complejo IV y el citocromo c se encuentran fosforilados, desfosforilándose en condiciones de estrés. Esto hace que se pierda el control respiratorio y el alostérico, por lo que el bombeo de H^+ no se frena y se provoca una hiperpolarización que, si bien puede incrementar la formación de ATP, también incrementa la formación de ROS que pueden llevar a la apoptosis.

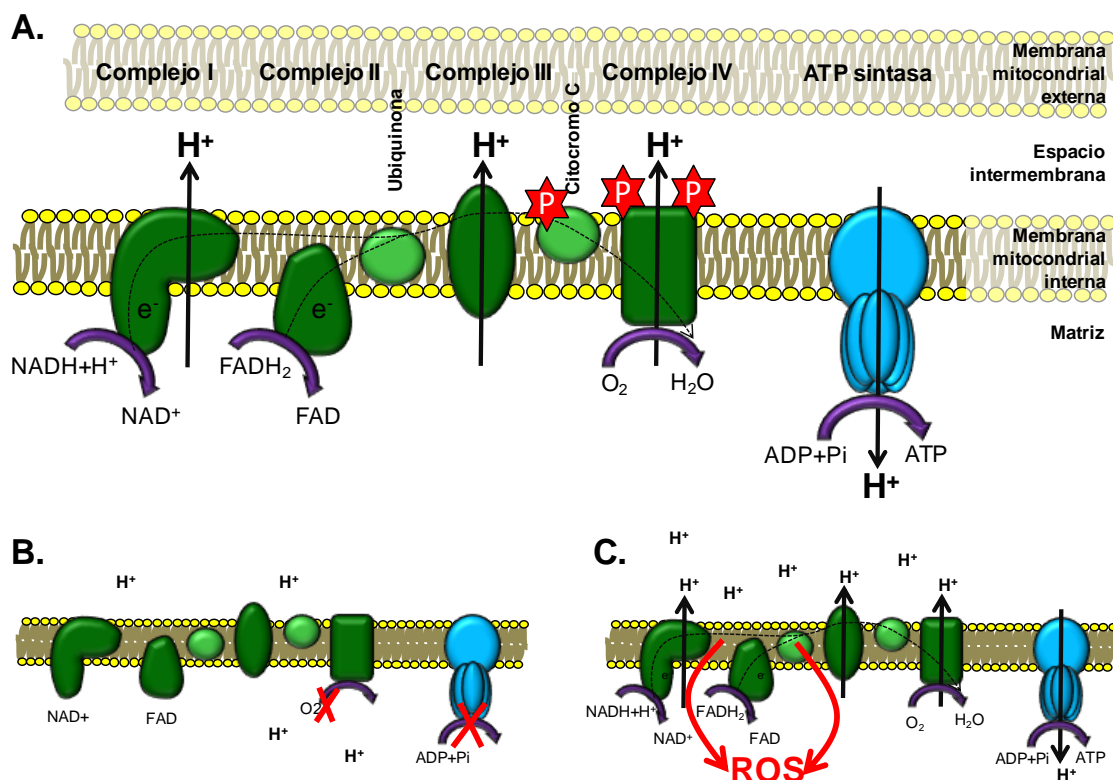


Figura 3. Alteración mitocondrial durante la isquemia/reperfusion. A. Funcionamiento normal de la cadena respiratoria (complejo IV y citocromo C fosforilados). B. Durante la isquemia se despolariza la membrana interna y se desfosforilan de los complejos. C. Tras la reperfusion, las alteraciones anteriores llevan a una hiperpolarización que sobreproduce ROS que, de ser excesivas, dañan a la propia cadena e inducen la muerte apoptótica.

En la isquemia se producen cuatro pasos fundamentales hasta llegar a la muerte celular: privación isquémica, hiperactivación inducida por reperfusión, disfunción mitocondrial y muerte celular tardía (Sanderson et al., 2013).

- Privación isquémica: La carencia de O₂, que es el aceptor final de electrones, hace que la cadena mitocondrial no funcione correctamente, por lo que el gradiente de protones se disipa rápidamente, provocando la depleción de ATP (**Figura 3B**). Como consecuencia, la célula pierde la capacidad de regular las concentraciones iónicas en la membrana plasmática, y se produce una entrada masiva de Ca²⁺ al citosol, que pasará a ser captado por la mitocondria. Este ión es un potente activador de las fosfatasa mitocondriales, como calcineurina, que desfosforila el complejo IV y el citocromo c. De esta manera, la cadena mitocondrial tenderá a estar hiperactiva (McCormack and Denton, 1993).
- Hiperactivación por reperfusión: Cuando se reoxigena el tejido, la cadena respiratoria desfosforilada lleva a la hiperpolarización de la mitocondria. Ésta tiene dramáticas consecuencias ya que, por encima de 140 mV, se dispara la formación de ROS (Liu, 1999) (**Figura 3C**). Existen algunas evidencias de que la mayoría de los ROS formados durante la isquemia se producen inmediatamente después de la reperfusión del tejido, sobre los 15 min.
- Disfunción mitocondrial: Unos 30 min después de la reperfusión, la respiración mitocondrial disminuye de forma drástica en las poblaciones celulares que están destinadas a morir, desapareciendo la formación de ATP, lo que colapsa el potencial de membrana y causa la muerte celular (Sims and Pulsinelli, 1987). El cambio de una mitocondria hiperactiva a una mitocondria disfuncional parece debido a que los ROS ocasionan un daño a los componentes de la cadena respiratoria y también a determinados lípidos, como la cardiolipina, que localizan dichos complejos.
- Muerte neuronal tardía: La cardiolipina, tras sufrir una peroxidación por ROS, libera citocromo c al espacio intermembrana, activando la vía intrínseca de la apoptosis (Kuwana and Newmeyer, 2003). De allí, bien por la formación de poros en la membrana externa o por la participación de determinadas proteínas apoptóticas (Bax, bak), pasa al citosol en donde formará el apoptosoma junto a caspasa 9 y apaf-1. El apoptosoma activará la caspasa 3, proteína en la que convergen las vías apoptóticas y que lleva a la ruptura proteolítica de cientos de proteínas.

Además de este daño por reperusión mediado por el estrés oxidativo, hay que añadir que la recanalización también facilita la infiltración de células inmunes, las cuales pueden contribuir a la lesión y alterar la microcirculación.

2.3. LA RESPUESTA DEL TEJIDO A LA ISQUEMIA: LA INFLAMACIÓN

Durante la isquemia, como consecuencia de la muerte celular por necrosis, se van a liberar una serie de moléculas o señales de peligro que inician la respuesta inflamatoria. Al mismo tiempo, la cascada isquémica progresa, desencadenando todo un conjunto de procesos bioquímicos que llevan a las células aún viables a liberar otras moléculas que participan en las vías lesivas y contribuyen a la inflamación e infiltración de células inmunes (**Figura 4**). El proceso inflamatorio se prolonga durante días y, si bien puede agravar el daño cerebral de forma aguda, también se sabe que su inhibición es contraproducente a períodos de tiempo más largos ya que inicia los procesos de resolución del daño y remodelado.

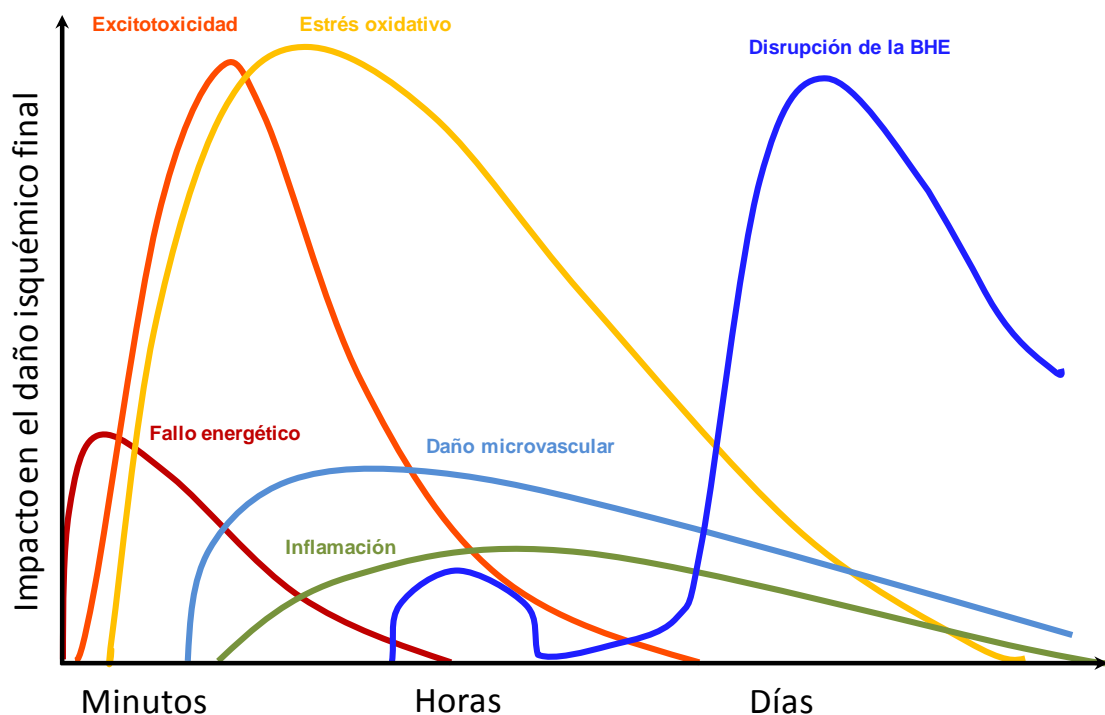


Figura 4. Secuencia temporal de eventos que participan en el daño isquémico (adaptado de (Brouns and De Deyn, 2009)).

2.3.1. La alteración de la expresión génica

Anteriormente se ha explicado cómo la isquemia producía una serie de eventos bioquímicos que disparaban mediadores intracelulares, como el Ca^{2+} . Estos activan todo un conjunto de enzimas proinflamatorias, básicamente NOS, proteasas y PLs que intervienen en el daño oxidativo, la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) y la liberación de mediadores proinflamatorios derivados de ácidos grasos, respectivamente. Además, estos mismos segundos mensajeros inducen un cambio en la expresión génica en las poblaciones celulares aún viables a través de determinados factores de transcripción. Entre ellos cabe citar el **factor inducible por hipoxia (HIF-1)**, el **factor nuclear- κB (NF- κB) (Figura 5)**, la proteína activadora-1 (AP-1) o los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs), aunque muchos otros resultan modificados (Yi et al., 2007). Todos ellos actúan al tiempo regulando la expresión de un conjunto de proteínas que van a promover la inflamación e infiltración de células inmunes y la destrucción del tejido dañado de forma aguda pero que, por otro lado, también son responsables de procesos de tolerancia a la isquemia, remodelado y reparación más a largo plazo.

Una de las primeras respuestas del tejido isquémico es la mediada por las citoquinas como la **interleuquina-1 (IL-1)** y el **factor de necrosis tumoral (TNF- α)**, que se liberan muy tempranamente (**Figura 5**), con un pico sobre las 12 h. Promueven procesos inflamatorios, básicamente la activación de la microglía, que libera más citoquinas y quimioquinas; la activación del endotelio, que expresa moléculas de adhesión, y la apoptosis de las células dañadas al activar la vía extrínseca (para revisión ver (Feuerstein et al., 1997; Allan and Rothwell, 2001)).

Junto a ellas aparecen las **quimioquinas**, como IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), que atraen respectivamente a neutrófilos (Liu et al., 1993) y monocitos circulantes (Wang et al., 1995) hacia el foco isquémico. Al tiempo, en el endotelio, se induce la expresión de **moléculas de adhesión** como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Wang et al., 1994) o P-selectinas, lo que va a posibilitar la entrada de células blancas al cerebro (**Figura 5**) (para revisión ver (Feuerstein et al., 1998)).

Además, se expresa toda una serie de **moléculas proinflamatorias** como iNOS o la ciclooxigenasa (COX), que intervienen en la formación de ROS; de proteínas proapoptóticas, como algunas caspasas, y de las metaloproteasas de matriz (MMPs) y

otras proteasas que destruyen la matriz extracelular y contribuyen a la alteración de la BHE (**Figura 5**). Sin embargo, también se sintetizan otras proteínas que podrían tener efectos beneficiosos, como proteínas de choque térmico (HSPs), que previenen la desnaturalización proteica, proteínas antioxidantes, antiapoptóticas, citoquinas antiinflamatorias como IL-10 o IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1) o, de forma tardía, factores de crecimiento y de remodelado tisular.

En este sentido, resulta muy importante la contribución del HIF-1, que se acumula rápidamente en el tejido isquémico (en condiciones normales es degradado) induciendo todo un conjunto de genes que presentan en su promotor el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Este mecanismo carece de importancia en *core* y penumbra, donde la isquemia es tan acusada que se produce rápidamente la muerte celular, pero es vital en el tejido circundante, que también se encuentra hipoperfundido. HIF-1 altera allí la expresión proteica, tratando de paliar la isquemia y de acostumar al tejido a ella. Estimula la síntesis de eritropoyetina (EPO) para la formación de glóbulos rojos; del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que promueve la angiogénesis; de proteínas de captación del hierro como la transferrina y su receptor (Tf y TfR), que disminuye la anemia y son antioxidantes, y de enzimas de la glucólisis anaerobia, que disminuyen la dependencia de oxígeno.

El efecto final de todas estas moléculas inducidas durante el ictus dependerá del equilibrio entre ellas y del grado de afectación de la célula por la isquemia, pudiendo participar tanto en procesos de muerte como de supervivencia celular (Allan and Rothwell, 2001).

2.3.2. Los receptores Toll-like

Uno de los primeros mecanismos inflamatorios en activarse tras la isquemia es la inmunidad innata. La muerte necrótica provoca la liberación del contenido celular al parénquima nervioso. Entre las moléculas vertidas se encuentran HSPs, fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) y ribonucleico (RNA) o la proteína de alta movilidad del grupo *box-1* (HMGB-1). Todas ellas se conocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y activan a un conjunto de receptores llamados **receptores Toll-like (TLRs)** (**Figura 5**).

Dichos receptores se descubrieron en mamíferos a finales de los '90 (Medzhitov et al., 1997) y se caracterizaron en la siguiente década (para revisión ver (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Carty and Bowie, 2011)). Son los primeros en estimular la inmunidad

innata al reconocer determinados componentes microbianos englobados con el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana o determinadas secuencias de RNA o DNA de virus.

En el sistema nervioso central (SNC), los TLRs se expresan de manera particularmente intensa en la microglía y en las células endoteliales. Durante la isquemia, la activación de estos receptores por los DAMPs provoca la síntesis de todo un conjunto de moléculas proinflamatorias mediada por factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Takeda and Akira, 2005). En el **endotelio**, la respuesta está encaminada a alterar la BHE y permitir la infiltración de células inmunes desde el torrente circulatorio. La activación de la **microglía** no sólo tiene lugar por la acción de los TLR, sino que en ella también participan las citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 (**Figura 5**), el exceso de glutamato en el parénquima que activa los receptores metabotrópicos (mGlu) e incluso la pérdida de sus uniones intercelulares con neuronas al morir éstas. Como consecuencia de esta activación, la microglía ayuda a expandir y perpetuar el proceso inflamatorio mediante la síntesis de más citoquinas e intervendrá en la eliminación del tejido dañado (para revisión ver (Iadecola and Anrather, 2011; Macrez et al., 2011)).

2.3.3. La alteración del endotelio y la infiltración

Uno de los primeros eventos que se produce en el endotelio cerebral tras la isquemia es la sobreproducción de radicales libres. Básicamente, debido a la éstasis venosa, las plaquetas y el complemento entran en contacto con la pared vascular y se activan produciendo especies oxidantes. Si bien el exceso de ROS no daña de manera inmediata a la célula endotelial, éstos sí que reaccionan con el NO, disminuyendo la disponibilidad de esta molécula en el entorno vascular (**Figura 5**). El NO es un potente vasodilatador, por lo que su carencia provoca una vasoconstricción capilar que podría agravar la isquemia (Ishikawa et al., 2004). La célula endotelial responde al propio estrés oxidativo, a la misma isquemia y al proceso inflamatorio consecuente (presenta TLRs y receptores de citoquinas) de dos formas diferentes.

Por un lado, se altera la selectividad de la permeabilidad de la BHE al inducirse la expresión de proteasas, básicamente MMP-9 aunque también otros tipos, y disminuir la de las proteínas que conforman las uniones estrechas entre células endoteliales. Otras proteasas liberadas y activadas por el tejido isquémico, plasmina entre ellas, van a degradar la lámina basal que rodea al endotelio. Así, en conjunto, se induce una primera **disrupción de la BHE** que ocasiona que las proteínas sanguíneas se extravasen al tejido

isquémico y al periférico. Junto a ellas se produce la salida de iones al parénquima que origina el **edema vasogénico**, que aumenta la presión intracraneal y puede comprimir la microcirculación (Brouns and De Deyn, 2009). Cuando la lesión vascular es masiva puede llegar a producirse el fenómeno de la TH que, por su importancia en la presente tesis doctoral, se explicará con posterioridad de forma detallada pero que, brevemente, consiste en la extravasación de sangre al parénquima nervioso.

Por otro lado, el endotelio también reacciona, como se ha explicado anteriormente, expresando moléculas de adhesión (ICAM-1) que van a anclar los leucocitos a las paredes de los vasos, principalmente neutrófilos y monocitos. Estos leucocitos, llamados al parénquima cerebral por las quimioquinas, comenzarán el proceso de **infiltración**, durante el cual contribuyen a la disrupción de la BHE al liberar más MMPs (Rosell et al., 2008) (**Figura 5**). Estas células blancas participan en el proceso inflamatorio, pero también degradan y fagocitan los restos celulares, iniciando así la **resolución y el remodelado**.

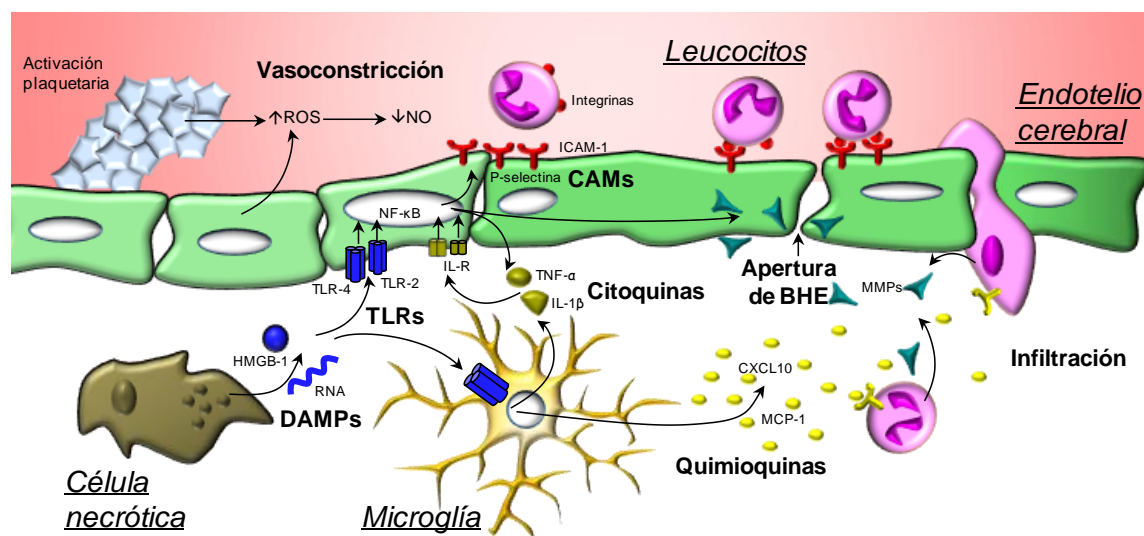


Figura 5. Primeros eventos de la inflamación post-isquemia. Rápidamente tras la isquemia se produce una activación plaquetaria que aumenta el estrés oxidativo, agravado durante la reperusión. Estas ROS disminuyen la disponibilidad de NO en el endotelio, provocando una vasoconstricción. La liberación de DAMPs por las células dañadas activa los TLR microgliales y endoteliales. La microglía responde sintetizando citoquinas que amplifican la respuesta inmune. El endotelio expresa CAMs que adhieren los leucocitos a la pared vascular, básicamente monocitos y neutrófilos. Estos, llamados al parénquima por las quimioquinas, comienzan a infiltrarse (adhesión, rodaje y extravasación), proceso durante el cual contribuyen a la disrupción de la BHE típica de isquemia.

3. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO Y SUS LIMITACIONES

Pese a su elevado impacto en la sociedad occidental y sus graves consecuencias, el ictus ha sido, y en la actualidad sigue siendo, uno de los mayores desafíos médicos por las escasas terapias existentes y por lo rápido que progresa hacia un daño neurológico irreversible. Aunque la inversión y la investigación en este campo han sido exhaustivas, pocos son los avances en cuanto al tratamiento, destacando el éxito de la terapia trombolítica con t-PA que, hasta la fecha, es el único fármaco aprobado para la fase aguda del ictus isquémico. Más recientemente, principalmente la prevención mediante el control de los factores de riesgo y la atención especializada en las unidades de ictus (definido en (Ringelstein et al., 2013)) han ayudado a disminuir la repercusión de esta enfermedad en las sociedades occidentales (Terent et al., 2009; Meretoja et al., 2011).

3.1. EL FRACASO DE LA NEUROPROTECCIÓN

En las últimas décadas ha habido un enorme esfuerzo por parte de la comunidad científica para avanzar en el conocimiento del ictus. Así, se han descrito multitud de vías moleculares que podrían estar participando en el daño isquémico, (explicado en el apartado “2.2. La cascada isquémica”) y, como consecuencia, más de 1000 agentes que interfieren con estos mecanismos lesivos han mostrado **neuroprotección** en la isquemia experimental (O'Collins et al., 2006). Sin embargo, estas terapias han fallado de forma contundente en su traslación a la clínica al ser incapaces de reproducir los efectos beneficiosos mostrados en animales (Kidwell et al., 2001).

Muchos autores han debatido sobre los motivos del fracaso de la neuroprotección (para revisión ver (Gladstone et al., 2002; Cheng et al., 2004; Young et al., 2007; Sutherland et al., 2012; Turner et al., 2013)), siendo especialmente importantes las recomendaciones de la **comisión STAIR** (*Stroke Treatment Academic Industry Roundtable*, para revisión ver (STAIR, 1999, 2001; Fisher, 2003; Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2007; Fisher et al., 2009; Albers et al., 2011)) que señalan qué se debe cambiar para mejorar la traslación. Aspectos especialmente reseñados por esta comisión son:

- La adecuación de los modelos de isquemia cerebral empleados (Green et al., 2003; Young et al., 2007), siendo los más usados los de oclusión mecánica cuando deberían ser los tromboembólicos, ya que reproducen mejor el modo en el que la isquemia y, muy especialmente, la reperusión tienen lugar en el

humano (recanalización paulatina por t-PA, mientras que en los modelos mecánicos la reperusión es brusca, lo que puede contribuir al daño isquémico (Hossmann, 2012)). Además, la mayoría de los modelos animales empleados son de isquemia/reperusión cuando deberían ser modelos permanentes, ya que la recanalización arterial no es frecuente en clínica.

- El uso de animales jóvenes, sanos y genéticamente homogéneos sometidos al mismo modelo experimental reduce mucho la variabilidad de la respuesta, cuando la población analizada en clínica presenta diferentes etiologías de ictus, es generalmente de avanzada edad, padece otras enfermedades crónicas y es muy heterogénea (Gladstone et al., 2002).
- Los estudios básicos deberían mostrar eficacia en el tratamiento post-isquémico y no sólo en el tratamiento previo o inmediato tras la oclusión (Cheng et al., 2004). De forma análoga, se ha sugerido que muchos ensayos clínicos podrían haber fallado por unas ventanas terapéuticas excesivamente amplias, dentro de las 6 h primeras tras el ictus, tratando de mejorar la trombolisis con t-PA, cuya ventana era de 3 h. A tiempos tan tardíos podría ocurrir que no quedara tejido al que rescatar de la isquemia o que no pudiera haber neuroprotección sin reperusión previa del tejido isquémico (Rother, 2008) o sin proteger a toda la unidad neurovascular en su conjunto (del Zoppo, 2006; Turner et al., 2013).

Pese a que algunos estudios con neuroprotectores han seguido las recomendaciones STAIR, han continuado fallando en la clínica, como es el caso del antioxidante NXY-059 (Feuerstein et al., 2008). Así, la investigación en este campo ha sufrido importantes modificaciones en cuanto al tiempo de estudio, animales y modelos empleados, etc, tratando de aproximarse lo más posible a la clínica. Además, muchos trabajos actuales que tratan de buscar nuevas terapias para el ictus se basan en otros dos enfoques completamente diferentes. Por un lado, están los estudios de **neurorreparación** y plasticidad, que tratan de paliar a largo plazo los daños producidos por un ictus sustituyendo al menos la función del tejido perdido. Por otro lado, y con resultados bastante esperanzadores en estudios experimentales y clínicos, se encuentra la **mejora de la terapia trombolítica**. El objetivo es aumentar el número de pacientes que puede beneficiarse de ella, ampliando su ventana terapéutica y paliando sus importantes efectos secundarios mediante terapias de reperusión alternativas o co-tratamientos (Zhang et al., 2012).

3.2. LA TERAPIA TROMBOLÍTICA

En 1995, el NINDS (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*) publicó por primera vez que un fármaco, el **t-PA**, resultaba beneficioso para el tratamiento del ictus isquémico, ya que disminuía los déficits a los 3 meses si se administraba dentro de las **3 primeras horas tras el inicio** de los síntomas (NINDS, 1995). La administración intravenosa (IV) de t-PA disuelve el coágulo de la arteria ocluida, restaurando la circulación cerebral. Así, en 1996, la FDA americana (*Food and Drug Administration*) aprobaba el uso de este fármaco para el tratamiento agudo del ictus isquémico. Estudios clínicos posteriores, como el ATLANTIS (*Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in ischemic stroke* (Albers et al., 2002)) y el ECASS (*European cooperative acute stroke study* (Steiner et al., 1998)), confirmaron este efecto beneficioso dentro de las 3 primeras horas, lo que llevó a la agencia europea, la EMA (*European Medicines Agency*), a aprobar el uso del t-PA en 2002.

Sin embargo, tanto el ATLANTIS (Clark et al., 1999) como los ECASS I (Hacke et al., 1995) y II (Hacke et al., 1998) no sólo no pudieron demostrar el efecto beneficioso del t-PA cuando se administraba más allá de las 3 primeras horas tras el inicio de los síntomas sino que, además, describieron que el uso tardío del fármaco aumentaba el riesgo de hemorragias intracerebrales (Larrue et al., 1997; Fiorelli et al., 1999; Larrue et al., 2001), las cuales se asocian a mal pronóstico. Así, para tratar de frenar la principal contraindicación del t-PA, la **transformación hemorrágica (TH)**, el fármaco sólo se administra en condiciones muy restrictivas, quedando excluidos pacientes mayores de 80 años, diabéticos o con hiperglucemia, hipertensos, tratados con anticoagulantes, con historia previa de ictus, con lesiones extensas o con efecto de masa antes del tratamiento, además de aquellos que sobrepasan la ventana terapéutica de 3 h (McArthur et al., 2011).

Por ello, pese a que la trombolisis era la única terapia disponible para el tratamiento del ictus, se estima que, en el mejor de los casos, menos del 2% de los pacientes la recibían a principios del siglo XXI, siendo los motivos principales su corta ventana terapéutica y los criterios de exclusión para controlar la TH. En el año 2004, un meta-análisis de los estudios NINDS, ECASS I y II y ATLANTIS mostró que la terapia trombolítica, si bien resultaba más beneficiosa cuanto antes se administrara, podría incluso tener un **efecto positivo aplicada hasta 4,5 h** desde el inicio de los síntomas (Hacke et al., 2004). Esta observación fue confirmada por el estudio ECASS III (Hacke et al., 2008), aunque ni la FDA estadounidense ni la EMA han modificado aún la ventana

terapéutica de 3 h del t-PA. En la actualidad se estima que, en algunos países, aproximadamente un 5% de los pacientes de ictus se benefician de la fibrinólisis. No obstante, el factor que más ha favorecido el uso del t-PA para el tratamiento del ictus no ha sido la ampliación de la ventana terapéutica, sino la atención de los pacientes en centros especializados, que actualmente administran el fibrinolítico a porcentajes bastante mayores al 10%. En cualquier caso, un 5-10% representa un porcentaje exiguo de pacientes que pueden beneficiarse del t-PA. Además, sobre un 50% de estos no reperfundan y se estima que el paciente tratado sólo tiene un 30% más de probabilidad de mejorar respecto al no tratado.

Hoy en día están siendo evaluadas algunas mejoras en la trombolisis que tienen por objeto **disminuir sus efectos secundarios**, principalmente **la TH**, y de extender el uso del t-PA. Las aproximaciones principales son el uso del t-PA incluso en grupos considerados de exclusión (Frank et al., 2013), otros trombolíticos, terapias combinadas con t-PA que permitan alargar su ventana (Albers et al., 2011), selección de pacientes más propensos a beneficiarse (Kidwell et al., 2013) y la perfusión mecánica (para revisión ver (Sacco et al., 2007)). Precisamente, la **trombectomía** ha probado su efecto beneficioso en el ictus y presenta mejores tasas de perfusión que la trombolisis (que ronda el 50%). Sin embargo, no ha mostrado ser superior a la fibrinólisis ni por sí sola (Ciccone et al., 2013) ni en combinación con la terapia estándar (Broderick et al., 2013), por lo que el t-PA continúa siendo el único tratamiento aprobado a pesar de sus restricciones. Así, la terapia de perfusión tiene grandes desafíos para las próximas décadas, como identificar aquellos pacientes más propensos a desarrollar TH o comprobar si existe alguna oportunidad para la neuroprotección en combinación con la recanalización arterial (para revisión ver (Davalos, 2005)).

3.2.1. El t-PA

El t-PA es una serín-proteasa de unos 70 kDa muy abundante en el plasma y en el SNC. Estructuralmente posee un dominio proteasa, donde reside la actividad catalítica; dos dominios “*kringle*”, responsables de la interacción del t-PA con la fibrina, y otros dominios menos relevantes. Pese a que es sintetizado como una molécula de una sola cadena y como tal es activo, la plasmina puede generar por proteólisis la molécula de t-PA de dos cadenas, que permanecen unidas por un puente disulfuro y que es unas 10 veces más activa (Rijken et al., 1982). Sin embargo, en el torrente sanguíneo, esta molécula viaja unida a los PAIs (inhibidores del activador del plasminógeno), que

inhiben su actividad. El t-PA es, como su propio nombre indica, el responsable de activar el zimógeno plasminógeno a **plasmina**, pero sus funciones van más allá de ser un mero activador.

Cuando hay un coágulo, el t-PA va a unirse a la red de fibrina a través de sus dominios “*kringle*”, lo que provoca un aumento de la afinidad por el plasminógeno. Éste, que también presenta estos dominios “*kringle*”, se une también a la red de fibrina, facilitándose la interacción entre ambas proteínas (Rijken, 1995; Lijnen, 2001) (**Figura 6**). Como consecuencia, los PAI se disocian y se forma plasmina sólo en el entorno del coágulo, que degradará la red de fibrina.

De igual manera, las células endoteliales expresan en su superficie la **anexina A2**, que es el llamado receptor de t-PA y plasminógeno (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005), que al unir ambas moléculas hace que confluyan en el espacio, aumentando la formación de plasmina unas 60 veces y ayudando a mantener la fluidez sanguínea. Por estos motivos, el t-PA actúa en sangre como un **fibrinolítico**, por lo que ha sido empleado con enorme éxito en terapias de perfusión en isquemia cardiaca e ictus (para revisión ver (Rijken and Lijnen, 2009)).

Por otro lado, el t-PA es muy abundante en el SNC donde, junto al plasminógeno, se une a otras proteínas de la MEC (matriz extracelular), básicamente fibronectina y laminina. Parece que, en condiciones normales, esta unión no tiene ningún efecto pero, cuando estas proteínas se degradan por procesos de remodelado tisular, algunos de sus fragmentos mantienen la capacidad de unirse al t-PA y lo activan, favoreciendo la formación de plasmina (Moser et al., 1993) (**Figura 6**). Por lo tanto, el t-PA, liberado por microglía y neuronas, ha sido implicado en procesos neurológicos que requieren de un **remodelado tisular** previo, como son la migración celular y la plasticidad sináptica asociada a procesos como el aprendizaje, la memoria y la potenciación a largo plazo (LTP (Qian et al., 1993)) (para revisión ver (Strickland, 2001; Yepes and Lawrence, 2004; Melchor and Strickland, 2005)). Sin embargo, un exceso de la actividad del sistema t-PA/plasmina podría llevar a la **destrucción de la MEC** y a la **muerte celular** (Chen and Strickland, 1997).

Otras acciones bastante novedosas del t-PA parecen ser independientes de la activación del plasminógeno (para revisión ver (Pawlak and Strickland, 2002)). En el torrente circulatorio, el t-PA es eliminado gracias a la acción del **LRP-1** (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) presente en las células endoteliales, que permite su internalización y degradación en el lisosoma.

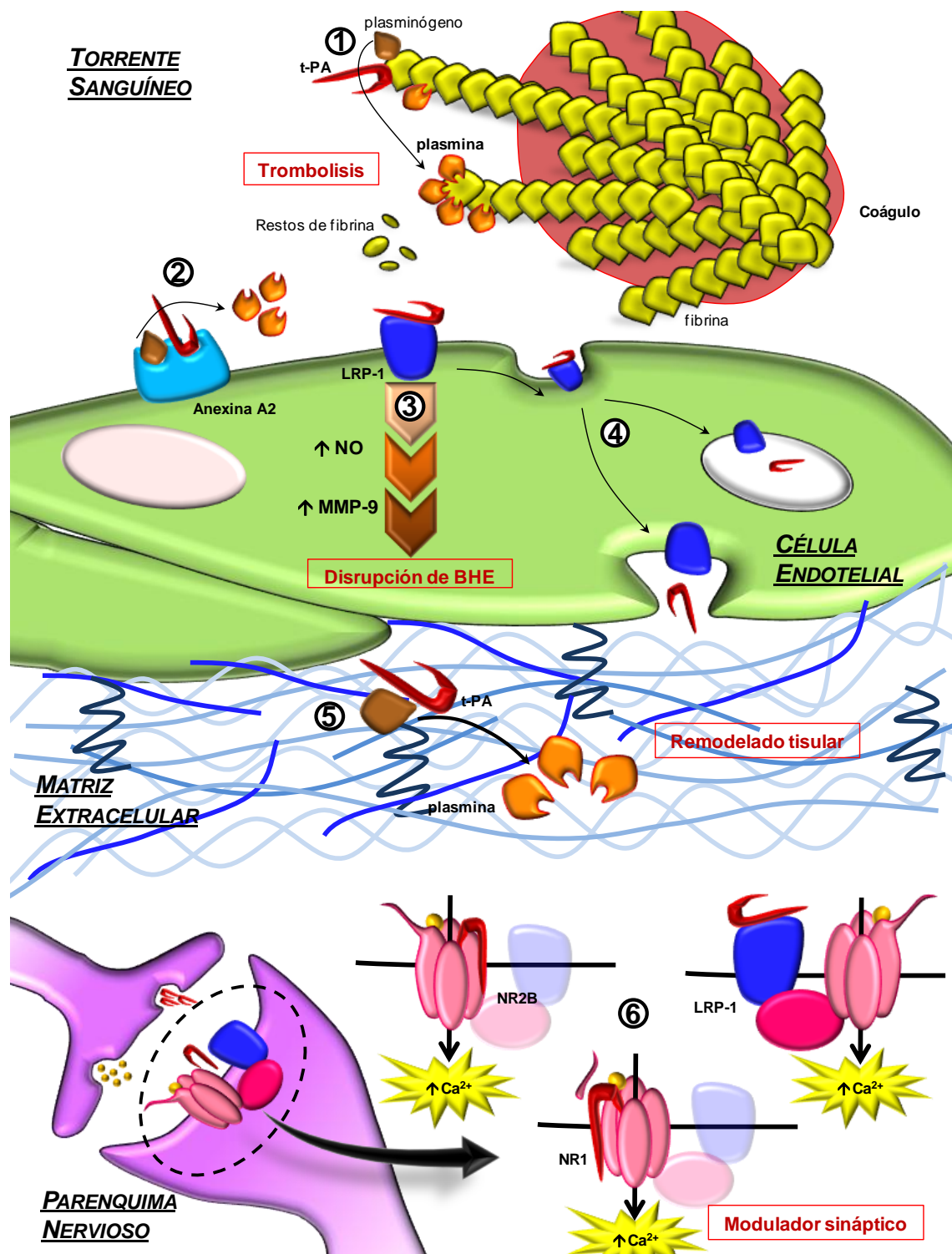


Figura 6. Funciones del t-PA. En el torrente sanguíneo, el t-PA cataliza la formación de plasmina que degradará el coágulo sanguíneo, bien uniéndose a la fibrina (1) o bien a su receptor, la Anexina A2 (2). En la célula endotelial, el LRP-1 facilita su degradación (4), pero también desencadena señales intracelulares que llevan a la apertura de la BHE (3). En la MEC, el sistema t-PA/plasmina se encarga del remodelado tisular (5). Mientras que en el parénquima nervioso es un modulador de la sinapsis, habiéndose propuesto como mecanismos la hidrólisis de NR1, la unión a NR2B y a LRP-1 (6).

Sin embargo, parece que este receptor media acciones que van más allá de la eliminación del t-PA. Se ha comprobado que, en condiciones fisiológicas, la unión del t-PA a LRP-1 desencadena una señal intracelular que incrementa la **permeabilidad de la BHE** (Yepes et al., 2003) (**Figura 6**) e incluso produce vasodilatación mediada por NO (Nassar et al., 2004). Esta respuesta podría ser fundamental para mejorar la perfusión sanguínea pero, ante procesos que lesionen la BHE, podría exacerbar el daño (para revisión ver (Yepes and Lawrence, 2004)). Tal es el caso del ictus, que provoca una degradación de la BHE bien documentada (para revisión ver (Yang and Rosenberg, 2011)). La adición de t-PA en estos casos parece inducir una mayor apertura de la BHE, tanto MMP-9-dependiente (Wang et al., 2003) como independiente (Copin et al., 2011), que puede ser lesiva a incluso llevar a la TH.

Además, en el SNC, cuando las neuronas se despolarizan también liberan t-PA (Gualandris et al., 1996), que parece implicado en procesos mediados por el receptor de glutamato NMDA. Por un lado, interviene en la hiperemia funcional que se produce como consecuencia de la liberación de NO mediada tras la activación NMDA (Park et al., 2008) y parece intervenir también en procesos de tolerancia isquémica (Echeverry et al., 2010) facilitando la captación de glucosa (Wu et al., 2012). Por otro lado, se ha comprobado que el t-PA interacciona con dicho receptor, aunque existe controversia sobre el modo en que se produce esta interacción. Se ha hipotetizado que, en la neurona post-sináptica, podría unirse a la subunidad NR2B (Pawlak et al., 2005), hidrolizar la subunidad NR-1 (Nicole et al., 2001) o bien interaccionar con el LRP-1, que se encuentra asociado al receptor NMDA (May et al., 2004). En cualquier caso, esta interacción del t-PA no activa al receptor NMDA pero, en presencia del agonista, incrementa la corriente de Ca^{2+} que pasa al interior celular (**Figura 6**). Esta función parece exclusiva de la forma de una cadena del t-PA (Parcq et al., 2012) y constituiría un mecanismo extra por el cual, en condiciones fisiológicas, el t-PA queda implicado en procesos de LTP y de **modulación de la sinapsis** (para revisión ver (Samson and Medcalf, 2006)). Sin embargo, ante procesos patológicos que impliquen una sobreactivación del receptor NMDA, el t-PA podría **facilitar la excitotoxicidad** al potenciar la entrada de Ca^{2+} , llevando así a la muerte celular (Tsirka et al., 1995; Tsirka et al., 1996). Del mismo modo, un exceso del sistema t-PA/plasmina podría ser el responsable de la muerte selectiva de algunas neuronas (Li et al., 2013).

Resumiendo, la principal acción del t-PA es disolver los coágulos promoviendo la fibrinólisis. Por ello ha sido empleado con éxito para el tratamiento de la isquemia

cardiaca e isquemia cerebral. Sin embargo, también es un regulador de las sinapsis glutamatérgicas, de la permeabilidad de la BHE e interviene en el remodelado tisular. El ictus isquémico altera gravemente estos procesos, hasta el punto de inducir la excitotoxicidad por glutamato y la disrupción de la BHE. Así, mientras el uso del t-PA, si produce una recanalización precoz, puede frenar estos mecanismos isquémicos, también podría contribuir a ellos y agravar el daño si no se produce reperusión o si esta ocurre demasiado tarde. Aunque el hecho de si el t-PA contribuye a la neurotoxicidad en el ictus es un tema de debate (que se tratará de explicar a continuación), sí parece bastante aceptado que participa en la disrupción de la BHE (detallado en el apartado “4.2.3. Disrupción por proteólisis”), hasta el punto de llegar a producir la extravasación de los componentes sanguíneos, que es lo que se conoce como la transformación hemorrágica del ictus isquémico.

3.2.2. Neurotoxicidad del t-PA en el ictus isquémico

Varios trabajos habían mostrado que el t-PA, cuando existe una estimulación de los receptores NMDA, potencia el proceso excitotóxico (Tsirka et al., 1995). La primera evidencia de que esto ocurría también en el ictus, donde hay una sobre-activación glutamatérgica, se publicó en 1998. Ratones deficientes para t-PA, tras ser sometidos a un modelo de isquemia/reperusión mecánico, presentaban un menor volumen de infarto que la cepa “silvestre” (Wang et al., 1998), lo que se corroboró en otros estudios (Nagai et al., 1999; Tsuji et al., 2005) y en isquemia global (Lee et al., 2007). Esto indica que el t-PA endógeno cerebral podría potenciar la excitotoxicidad típica de la isquemia.

Pero ¿qué ocurre con el t-PA exógeno que se administra? Wang y colaboradores también encontraron que la administración IV del fármaco aumentaba el volumen del infarto respecto al tratamiento con salino. Otros trabajos corroboraron estos hallazgos (Kilic et al., 2001; Armstead et al., 2006), e incluso se mostró que, antagonizando el receptor NMDA, se impedía la participación en el daño excitotóxico (Kilic et al., 2005). Sin embargo, la administración de t-PA no aumentaba la lesión respecto a la que se producía en una isquemia permanente. Además, otros estudios han sido incapaces de ver este efecto deletéreo del t-PA exógeno en el ictus (Klein et al., 1999; Meng et al., 1999; Tabrizi et al., 1999; Kilic et al., 2004; Tsuji et al., 2005). Destaca el estudio de Meng y colaboradores que observaron que el tratamiento con t-PA inducía la reperusión en un modelo trombótico y disminuía el volumen de infarto respecto a una

oclusión permanente, pero que no aumentaba el daño respecto a un modelo de oclusión/reperfusión mecánico.

Sin embargo, a menos que el t-PA exógeno pueda cruzar la BHE, su importancia en este proceso es discutible. Hoy en día se sabe que la BHE se abre de manera bifásica tras un ictus, por lo que el t-PA podría atravesar fácilmente la BHE y, aunque no fuera así, se ha descrito que el LRP-1 media el paso por transcitosis incluso en la barrera intacta (Benchenane et al., 2005). Así, mientras parece que el t-PA endógeno podría participar en el proceso excitotóxico acelerando la muerte del tejido isquémico, la administración intravascular del fármaco, si produce reperfusión (especialmente cuando es temprana), impide la progresión del daño isquémico, aunque no se puede descartar que parte se extravase al parénquima cerebral y exacerbe la muerte excitotóxica, aunque sólo en la zona comprometida (para revisión ver (Kaur et al., 2004; Harston et al., 2010)).

4. LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA DEL ICTUS ISQUÉMICO

La TH es un fenómeno por el cual, tras un ictus isquémico y como consecuencia del daño a la BHE, se produce una hemorragia intracerebral. Este proceso forma parte de la evolución natural del ictus isquémico, estimándose que se produce espontáneamente entre un 40-50% de los pacientes (Hornig et al., 1986; Arnould et al., 2004). Sin embargo, muchos de estos casos son asintomáticos y no ocurren en las primeras 24 h, por lo que resulta difícil de cuantificar. Los sangrados importantes, considerados en la bibliografía como hemorragias parenquimales o sintomáticas, son muchos menos, sobre un 2-5% (para revisión ver (Khatri et al., 2007)), aunque se asocian a deterioro y comprometen enormemente la vida del paciente (Fiorelli et al., 1999) hasta el punto de elevar la mortalidad al 45% ((NINDS, 1995) (incluso al 83% para otros trombolíticos como la urokinasa (Furlan et al., 1999)). Dichas hemorragias extensas contribuirían al deterioro por tres mecanismos: ejerciendo un daño mecánico al comprimir las estructuras aledañas, por un daño isquémico debido a compresión capilar en el territorio circundante y por un daño tóxico de los componentes sanguíneos extravasados (para revisión ver (Wang and Lo, 2003)).

Pese a que la TH forma parte de la evolución natural del ictus, se sabe que la recanalización del vaso ocluido y muy especialmente la terapia trombolítica aumentan el riesgo de sangrado sintomático (sobre un 8-9% (Larrue et al., 1997; Larrue et al., 2001)), razón por la cual se limita su uso. Hoy en día una de las principales líneas de

investigación en el campo del ictus es conocer los mecanismos por los cuales se produce la TH, que no es otra cosa más que una disrupción de BHE exacerbada, y muy especialmente aquellos que son potenciados por la recanalización arterial por t-PA.

4.1. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La BHE es una barrera de difusión que limita el paso de sustancias del torrente sanguíneo al parénquima cerebral y viceversa y que queda formada, básicamente, por el endotelio cerebral (Reese and Karnovsky, 1967). Su existencia se conoce desde finales del siglo XIX, cuando Paul Ehrlich observó que un colorante inyectado en la sangre teñía todas las estructuras del organismo excepto el cerebro, deduciéndose que existía algún tipo de barrera que impedía la entrada del colorante al SNC. Hoy en día se sabe que la BHE no es la única que mantiene aislado al SNC en un entorno privilegiado, sino que se complementa con otras dos barreras: la **hematolical** (BHE-LCR), formada por las células de los plexos coroideos, que producen el LCR (líquido cefalorraquídeo) y lo separan de la sangre, y la **subaracnoidea**, formada por el epitelio de la aracnoides y que aísla el LCR del resto de tejidos (**Figura 7**).

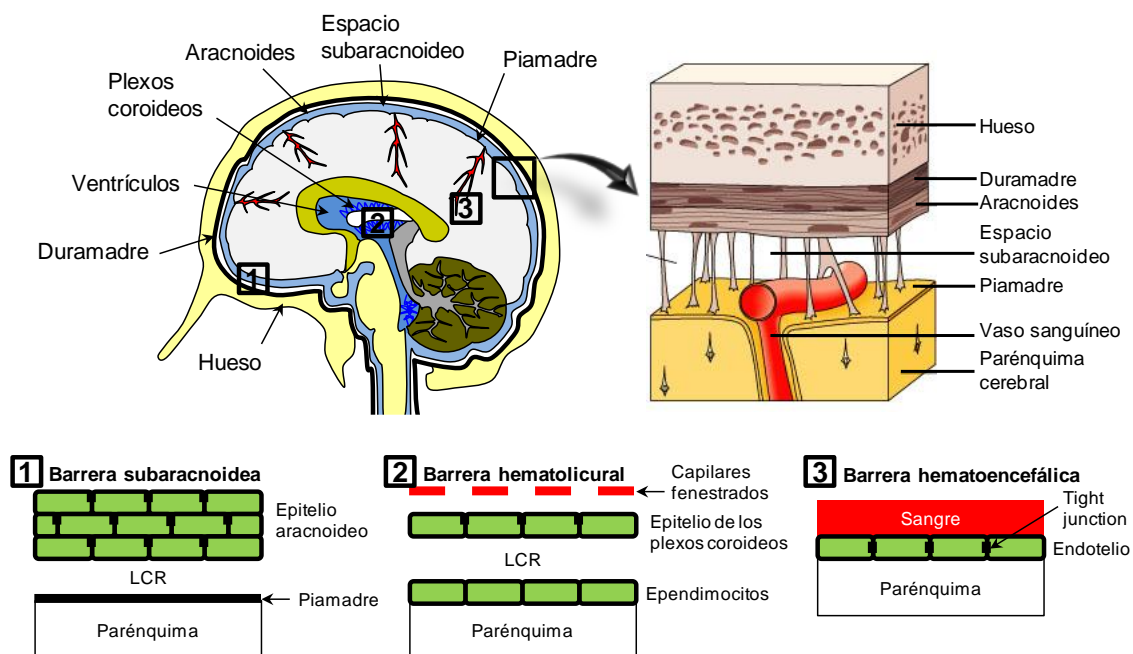


Figura 7. Barreras del encéfalo. Esquema representativo de las diferentes barreras que mantienen en un entorno único al cerebro (adaptado de (Abbott et al., 2010)).

4.1.1. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica

La BHE va a mantener aislado al cerebro en un entorno único y estable que garantiza su correcto funcionamiento (para revisión ver (Abbott et al., 2010)). Por un lado, mantiene unas concentraciones iónicas de K^+ (Hansen, 1985), Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- o pH (Nischwitz et al., 2008) diferentes de las del plasma y resto de tejidos, óptimas para garantizar el correcto funcionamiento de la transmisión nerviosa. Además, algunos aminoácidos actúan como neurotransmisores (glutamato, glicina), por lo que su concentración en LCR y líquido intersticial será mucho menor que en plasma (Bernacki et al., 2008). La BHE también previene ampliamente el paso de macromoléculas; muchas proteínas sanguíneas activan vías apoptóticas en el parénquima nervioso, bien de forma directa, como la inmunoglobulina G (IgG) y la albúmina (Nadal et al., 1995) o bien indirectamente, siendo convertidas a su forma tóxica en el parénquima, como la pro-trombina o el plasminógeno (Gingrich and Traynelis, 2000). Por ello, la concentración proteica difiere por completo de la plasmática (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones a un lado y otro de la BHE (adaptado de (Begley, 2007)).

| | Unidades | Plasma | LCR | Ratio |
|-------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Osmolaridad | mOsmol | 305,2 | 298,1 | 1 |
| pH | | 7,4 | 7,3 | |
| K^+ | mM | 4,6 | 2,9 | 0,63 |
| Ca^{2+} | mM | 5,0 | 2,5 | 0,5 |
| Mg^{2+} | mM | 1,7 | 2,4 | 1,4 |
| Cl^- | mM | 101 | 124 | 1,23 |
| Aminoácido total | μM | 2890 | 890 | 0,31 |
| Glutamato | μM | 83 | 1,79-14,7 | 0,02-0,18 |
| Glicina | μM | 249 | 4,7-8,5 | 0,012-0,034 |
| Arginina | μM | 80 | 14,2-21,6 | 0,18-0,27 |
| Alanina | μM | 330 | 23,2-32,7 | 0,07-0,1 |
| Serina | μM | 149 | 23,5-37,8 | 0,16-0,25 |
| Proteína total | mg/dl | 70 | 0,433 | 0,006 |
| Albúmina | mg/dl | 42 | 0,192 | 0,005 |
| Ig G | mg/dl | 9,78 | 0,012 | 0,001 |
| Transferrina | mg/dl | 2,6 | 0,014 | 0,005 |
| Plasminógeno | mg/dl | 0,7 | 0,000025 | 0,00004 |
| Fibrinógeno | mg/dl | 325 | 0,00275 | 0,000008 |

De igual manera, la BHE impide la entrada de la gran mayoría de moléculas, muchos metabolitos endógenos y xenobióticos que podrían resultar tóxicos para el

cerebro o alterar la función nerviosa. Prácticamente solo las moléculas pequeñas y apolares podrán cruzar esta barrera de selectividad (Liu et al., 2004) aunque, incluso para ellas, el endotelio presenta los transportadores *ATP-binding cassette*, que devuelven estas moléculas apolares al torrente sanguíneo (Begley, 2004). No obstante, la BHE asegura el correcto aporte de nutrientes al SNC a través de dos mecanismos exclusivos del endotelio cerebral: una amplia gama de transportadores, cada uno de ellos específico de una molécula o un grupo de ellas (Zhang et al., 2002a), y la transcitosis, por la que algunas moléculas llegan al parénquima al atravesar el endotelio en pequeñas vesículas de transporte (de Lange, 2012).

4.1.2. Estructura de la barrera hematoencefálica

Físicamente, la BHE queda formada por el endotelio cerebral. Frente a este concepto clásico, hoy en día se acepta que otros elementos contribuyen a su desarrollo y correcto funcionamiento, como los pericitos, la MEC y los astrocitos, mientras que las neuronas y la microglía pueden alterarlo. Este conjunto es lo que se ha definido como **unidad neurovascular (UNV)** (Figura 8) (para revisión ver (Sandoval and Witt, 2008)):

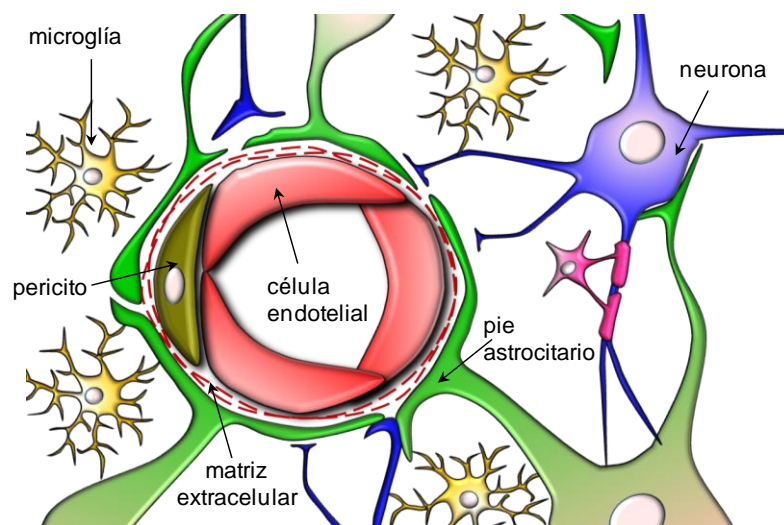


Figura 8. Esquema de la unidad neurovascular.

- **Endotelio:** presenta las particularidades, respecto al endotelio periférico, de no ser fenestrado, tener pocas vesículas de pinocitosis, gran cantidad de mitocondrias (Oldendorf et al., 1977) y, sobre todo, de presentar unas uniones intercelulares únicas: las *tight junctions* (TJs) (Hawkins and Davis, 2005).

- MEC: compuesta por colágeno IV, laminina, fibronectina, elastina y diferentes proteoglicanos, rodea al endotelio y pericitos, constituyendo su soporte físico.
- Pericitos: (para revisión ver (Sa-Pereira et al., 2012)) cubren alrededor de un 25% de la membrana basal del endotelio, siendo fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de la BHE (Hellstrom et al., 2001). Aunque su función exacta es objeto de debate parece que intervienen en la angiogénesis (Armulik et al., 2005), regulan la permeabilidad vascular (Dore-Duffy and LaManna, 2007) y el flujo sanguíneo por su contracción (Peppiatt et al., 2006).
- Astrocitos: los pies astrocitarios se encuentran recubriendo más del 90% de la superficie de la microvasculatura y se ha visto que son esenciales para la formación de la BHE, interviniendo en la formación de las TJs (Abbott et al., 2006) y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Koehler et al., 2006).
- Neuronas y microglía: Aunque no forman la BHE propiamente dicha tienen capacidad para alterarla. Por un lado, las neuronas inervan directamente los vasos sanguíneos interviniendo en la regulación del tono (Hamel, 2006). Por otro, la microglía puede alterar la permeabilidad de la BHE secretando citoquinas, quimioquinas, ROS y proteasas (Stamatovic et al., 2005; Ronaldson and Davis, 2012).

4.1.3. Las *tight junctions*

Gran parte de la barrera de permeabilidad entre la sangre y el parénquima nervioso queda configurado por las uniones que se dan en el endotelio cerebral, que sellan el espacio entre dos células contiguas como si de una cremallera se tratara, impidiendo la libre circulación de moléculas. Estas uniones quedan formadas por dos tipos de estructuras diferentes, las TJs o uniones estrechas, en la parte más apical de la membrana, y las uniones adherentes (AJs), también en la parte apical, pero justo debajo de las TJs (**Figura 9**):

- Las AJs: quedan formadas por la proteína transmembrana cadherina (tipos VE, P y N), que se une a las cadherinas de la célula contigua. En su porción citoplasmática se unen a las cateninas p120, γ y β que a su vez se ensamblan a la catenina α y ésta al citoesqueleto de actina (Dejana et al., 2008). Parecen fundamentales para la formación y estabilización de las TJs.

- Las TJs: quedan constituidas por tres tipos de proteínas transmembrana diferentes, las claudinas, las ocludinas y las JAMs (*junction adhesion molecules*). Todas ellas interaccionan homofilicamente con la célula adyacente e intracelularmente con un conjunto de proteínas citosólicas que las anclan al citoesqueleto. Las **occludinas** interaccionan con **ZO-1, 2 y 3** (*zonula occludens*), que van a anclar el complejo al esqueleto de actina (Feldman et al., 2005). No parecen ser fundamentales en la formación de las TJs, pero sí desempeñan funciones de regulación de la permeabilidad ya que, dependiendo de su estado de fosforilación, se ensamblan o desensamblan (Rao et al., 2002; Kago et al., 2006). Las **claudinas** también interaccionan con ZO-1 y 2 para anclarse al citoesqueleto y son, básicamente, las responsables de formar las TJs (Piontek et al., 2008), aunque variaciones en su estado de fosforilación también se han asociado a un aumento en la permeabilidad de la BHE (Soma et al., 2004; Yamamoto et al., 2008). Las **JAMs** son miembros de la superfamilia de las Ig que interaccionan citosolicamente con ZO-1 y afadina (Ebnet et al., 2003) y que intervienen en la estabilización de las uniones y en disminuir la permeabilidad (Mandell et al., 2004).

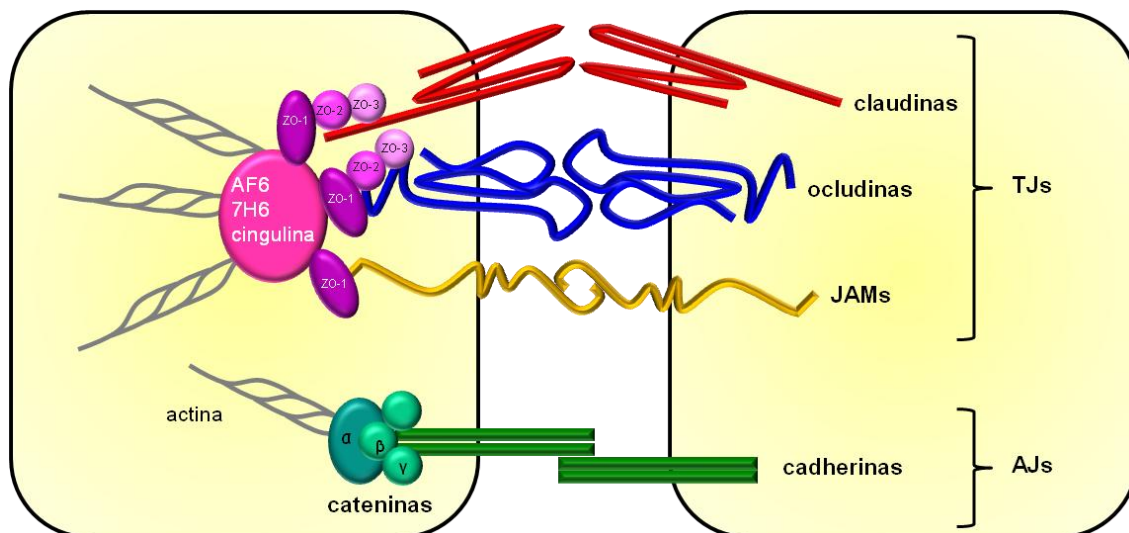


Figura 9. Esquema de las uniones en el endotelio cerebral. En la membrana apical se encuentran las TJs, formadas por claudinas, ocludinas y JAMs que mediante proteínas intracelulares como ZO-1 se anclan al citoesqueleto, y las AJs, formadas por cadherinas que se unen al citoesqueleto mediante las cateninas (adaptado de (Abbott et al., 2010)).

4.2. MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

Los mecanismos moleculares que desencadenan el proceso de disrupción de la BHE, que llevado al extremo en el ictus produce la TH, son complejos y no se conocen con detalle, siendo en la actualidad una de las áreas de estudio más interesantes no sólo en el campo del ictus (para revisión ver (Wang and Lo, 2003; Sandoval and Witt, 2008; Jin et al., 2010)), sino también en otras enfermedades neurodegenerativas (para revisión ver (Zlokovic, 2008)). Los eventos bioquímicos que alteran la BHE durante la isquemia pueden agruparse en tres grandes bloques: los desencadenados por el estrés oxidativo (para revisión ver (Fraser, 2011)), los derivados de la inflamación y aquellos producidos por proteólisis (**Figura 10**). Todos ellos confluyen en la degradación de la MEC por un lado y la alteración de las proteínas de las TJs por otro. Además, a largo plazo se puede producir TH por factores pro-angiogénicos, los cuales no serán explicados debido a que no ejercen un papel fundamental en la TH que se produce de forma aguda.

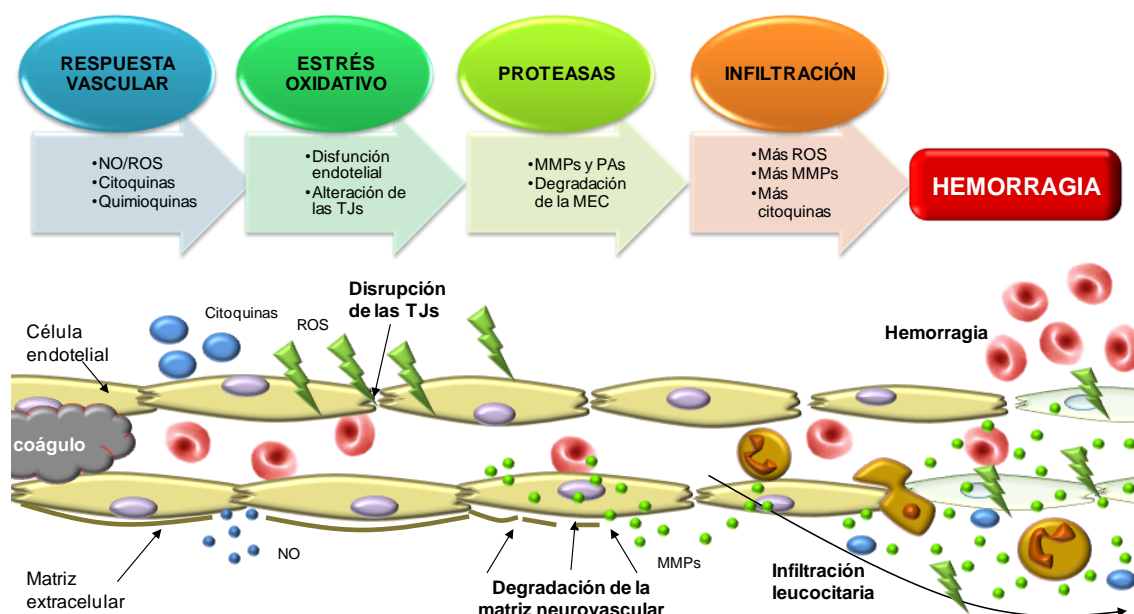


Figura 10. Mecanismos de transformación hemorrágica.

4.2.1. Disrupción por estrés oxidativo

Las diferentes ROS comienzan a aparecer muy poco tiempo después de la isquemia, alcanzando un pico en las primeras horas. Sin embargo, su producción se dispara cuando se produce la reperusión (Peters et al., 1998), aunque poco tiempo después descienden muy por debajo de los valores en isquemia (Nelson et al., 1992).

Desde hace tiempo, la producción de estos radicales ha sido asociada con la disrupción de la BHE, ya que la inyección de especies oxidantes induce un edema cerebral (Chan et al., 1984), seguido de la extravasación proteica al parénquima y, de igual manera, la administración de un antioxidante lo reduce (Martz et al., 1989; Woodfin et al., 2011). En modelos trombóticos, la administración de atrapadores de ROS disminuye la aparición de hemorragias espontáneas (Lapchak et al., 2001) o inducidas por t-PA (Asahi et al., 2000). Además, estas ROS **se localizan principalmente en el endotelio** (Kontos et al., 1992) y están elevadas en los grupos de riesgo de TH en situaciones basales, indicando una disfunción endotelial previa a la isquemia (Olmez and Ozyurt, 2012). Como ya se ha explicado anteriormente, la fuente principal de estas especies oxidantes es la cadena respiratoria mitocondrial, pero otras enzimas contribuyen de manera importante. Principalmente son: las diferentes NOS, que contribuyen indirectamente al formar NO, que va a generar el anión peroxinitrito, mucho más oxidante que otros, las NOX (NADPH oxidasa), COX y LO (lipooxigenasa), que se encargan del metabolismo del ácido araquidónico (para revisión ver (Winterbourn, 2008)).

Los mecanismos moleculares que subyacen a la disrupción de BHE mediada por ROS se han estudiado básicamente en cultivos celulares. La adición de H₂O₂ a una cultivo de endotelio cerebral de rata demostró que el aumento en la permeabilidad se producía por una migración de las proteínas ZO-1 (Van der Goes et al., 2001) y claudina (Lee et al., 2004) fuera de las tight junctions. Estos movimientos quedan dirigidos por el cambio en la fosforilación de estas proteínas, promovido por la alteración de la concentración intracelular de Ca²⁺ (vía ROS/RhoA/PI3K/PKB) (Fischer et al., 2005; Schreibelt et al., 2007). Además, se ha comprobado que las ROS son capaces de inducir las MMPs, especialmente la MMP-9 (Haorah et al., 2007), y de activarlas por S-nitrosilación (Gu et al., 2002).

4.2.2. Disrupción por neuroinflamación

La inflamación es el segundo de los mecanismos por los cuales se produce un daño a la BHE, típico de patologías como la esclerosis múltiple (Kirk et al., 2003), la encefalopatía asociada al síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) (Miller and Meucci, 1999), o la enfermedad de Alzheimer (Zlokovic, 2005). Las dos principales citoquinas proinflamatorias que se liberan de forma temprana tras la isquemia, IL-1 (Holmin and Mathiesen, 2000) y TNF- α (Hosomi et al., 2005), median acciones directas sobre la barrera y contribuyen a su disrupción. Al unirse a sus

receptores también son capaces de alterar la expresión de otras proteínas implicadas en la disrupción de BHE, induciendo las MMPs y la formación de ROS. De forma semejante, parece que algunas quimioquinas, fundamentalmente MCP-1, tienen acciones directas sobre la permeabilidad de la barrera al regular proteínas de las TJs (Stamatovic et al., 2003; Stamatovic et al., 2005), básicamente ocludina, claudina y ZO-1 y 2 (Dimitrijevic et al., 2006).

Sin embargo, la acción fundamental de los mediadores inflamatorios es coordinar una respuesta inmune periférica en función del daño. Así, también inducen una expresión de CAMs en el endotelio cerebral y promueven el reclutamiento de células inmunes hacia el foco isquémico. Los neutrófilos (Rosell et al., 2008) y los monocitos se van a adherir a las paredes vasculares y a extravasarse, contribuyendo de forma determinante al daño a la BHE y a la desorganización de las TJs (Bolton et al., 1998), ya que liberan especies oxidantes, citoquinas y proteasas durante el proceso. Además, parece durante la infiltración de estas células se produce algún tipo de interacción con las JAMs de las TJs, lo cual contribuye a la apertura de la BHE (Weber et al., 2007).

4.2.3. Disrupción por proteólisis

Muchas son las proteasas que se inducen durante la isquemia, como las catepsinas o las heparanasas, pero dos merecen especial atención ya que parecen ser las principales responsables de las alteraciones vasculares durante la isquemia: el t-PA y las MMPs. Ambas degradan la MEC hasta el punto de asociarse estrechamente a TH.

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de cinc (para revisión ver (Rosenberg, 2002), de entre las que destacan las MMP-9, 2 (colagenasas) y 3 (degrada laminina). Son sintetizadas en forma inactiva por prácticamente todas las células del SNC, abundando especialmente en endotelio, microglía y células inmunes infiltradas (del Zoppo et al., 2007). Su sobreexpresión en el cerebro isquémico ha sido ampliamente demostrada (Rosenberg et al., 1996; Heo et al., 1999), participando en su inducción y activación estímulos como citoquinas (Rosenberg et al., 1995), ROS (Gasche et al., 2001) y nitrosilación (Gu et al., 2002). El primer período de la apertura bifásica de la BHE se ha asociado a un aumento de actividad de MMP-2 (es constitutiva) (Chang et al., 2003), mientras que la disrupción posterior parece deberse a MMP-9 y se asocia a edema vasogénico y TH (Montaner et al., 2001; Castellanos et al., 2003; Inzitari et al., 2013). Además, la MMP-9 liberada por los neutrófilos infiltrados parece contribuir de forma significativa a la disrupción de la BHE (Justicia et al., 2003; Gidday et al., 2005;

Rosell et al., 2008; Ludewig et al., 2013), lo que facilita la extravasación de más células blancas. Los mecanismos por los que las MMPs participan en la disrupción de BHE son la degradación de la MEC, ya que degradan fibronectina, laminina y colágeno de la lámina basal y la degradación o deslocalización de proteínas de las TJs como ZO-1 (Asahi et al., 2001) o claudina-5 (Yang et al., 2007).

En cuanto al t-PA, como se ha explicado anteriormente, se sabe que se expresa en el SNC y que en las primeras horas tras la isquemia se libera en los alrededores de la vasculatura (Yepes et al., 2003). Esto produce, por un lado, la activación de la plasmina que a su vez degrada la MEC y, por otro, parece mediar la apertura de la BHE. Algunos autores destacan que tanto el t-PA endógeno como el administrado para la recanalización producen una regulación al alza de las MMPs, fundamentalmente MMP-2 y 9 (Aoki et al., 2002; Sumii and Lo, 2002; Tsuji et al., 2005). Parece que esta inducción queda mediada por la unión del t-PA al LRP, lo que activa el factor de transcripción NF- κ B e induce MMP-9 (Wang et al., 2003). Sin embargo, evidencias más recientes apuntan a que el t-PA media la disrupción de BHE sin implicar a esta proteasa (Yepes et al., 2003; Copin et al., 2011), posiblemente induciendo la MMP-3 (Suzuki et al., 2009) que a su vez activa a la MMP-9.

A estos mecanismos de daño desencadenados por el t-PA se une el hecho de que posibilita la reperusión. Esto ocasiona, por un lado, la exacerbación de la producción de ROS y posibilita la llegada de más células blancas al foco isquémico, lo que contribuye a extender el daño a la BHE y, por otro, posibilita la extravasación sanguínea. Además, se ha visto que el t-PA puede promover la degranulación de los neutrófilos, liberándose su contenido de MMP-9 (Cuadrado et al., 2008). Sin embargo, un estudio reciente en el que se compara la recanalización por trombectomía con la fibrinólisis apunta a que la TH aumenta por igual en ambos grupos respecto a las tasas de TH espontánea, y que tanto la magnitud de los sangrados como el deterioro al que se asocia son, por lo tanto, independientes del t-PA y están ocasionados por la propia reperusión (Ciccone et al., 2013).

Por lo tanto, la TH es parte de la evolución natural del ictus isquémico ya que los mecanismos que la desencadenan comienzan a activarse al poco tiempo de producirse la oclusión arterial. Sin embargo, determinados procesos como la recanalización arterial y el tratamiento con t-PA pueden exacerbarla, razón por la cual su uso queda limitado. Así, el avance en el conocimiento de los mecanismos por los que se produce, la identificación de los pacientes más propensos a sufrirla y la sustitución de la terapia

trombolítica por otra más eficaz y con menos riesgos de sangrado resultaría de enorme beneficio para el tratamiento del ictus.

4.3. LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA EN LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Siendo la TH la complicación más temida de la terapia trombolítica y el principal motivo del escaso uso del t-PA, parece bastante evidente que muchos estudios actuales sobre esta enfermedad se centren en estudiar los mecanismos moleculares que inducen la degradación de la BHE para así poder diseñar fármacos dirigidos a frenar este proceso. Impedir la TH o identificar los factores de riesgo propios de la disrupción de la BHE no sólo conllevaría que muchos más pacientes pudieran beneficiarse de la trombolisis, sino que abriría una nueva esperanza para los fármacos neuroprotectores, esta vez en combinación con terapias de perfusión. Por lo tanto, es realmente importante avanzar en el conocimiento de este proceso, para lo cual se necesitan modelos experimentales que simulen lo mejor posible lo que ocurre durante un ictus humano, que permitan la perfusión con t-PA y que produzcan el fenómeno de la TH.

No obstante, resulta curioso que la inmensa mayoría de los trabajos básicos sobre ictus, empleando diferentes modelos experimentales, no mencionen la presencia de sangrados e, incluso, que muchos afirmen explícitamente que no se detectan hemorragias visibles en los animales tras la isquemia. Algunos de estos modelos animales son tromboembólicos y simulan bastante bien la situación clínica, pudiendo ser incluso reperfundidos con t-PA. Entonces, ¿por qué no se produce TH en experimentación animal cuando en el humano ocurre hasta en un 40% de los pacientes? Algunos investigadores han señalado que los animales empleados en investigación son jóvenes y sanos, mientras que los pacientes de ictus a menudo padecen otras enfermedades que contribuyen a la lesión vascular como arterioesclerosis, diabetes, hipertensión, etc.

Incluso sin producir TH, estos modelos resultan útiles, aunque limitados, para el estudio de los mecanismos que alteran la composición, estructura y funcionalidad de la BHE. De igual manera, los cultivos celulares y los modelos de BHE pueden aportar una valiosa información y su contribución no debe ser subestimada. Sin embargo, parece clara la necesidad de mejorar la traslación de la básica a la clínica y para ello se necesitan modelos animales en los que se produzca TH, a ser posible modelos tromboembólicos reperfundibles por t-PA, por ser la situación más semejante a la clínica.

4.3.1. TH en los modelos de oclusión mecánica

El modelo de isquemia cerebral más empleado es la oclusión intraluminal de la ACM que, brevemente, consiste en insertar un filamento en la carótida externa y avanzarlo por la interna hasta alojarlo en el nacimiento de la ACM en el polígono de Willis (Longa et al., 1989). Suele realizarse reperusión del tejido sobre los 90 min retirando el filamento; de lo contrario el daño puede ser muy grave y comprometer la vida del animal.

Pese a que ha sido ampliamente empleado, apenas existen artículos que mencionen la aparición de hemorragias. Sin embargo, la reperusión tardía en combinación con la administración de t-PA parece potenciar el daño a la BHE e inducir TH (Pfefferkorn and Rosenberg, 2003; Strbian et al., 2007; Li et al., 2011). Empleando el mismo modelo en ratón, Ishiguro y colaboradores encontraron que la reperusión mecánica, 6 h tras la isquemia, no reducía el tamaño de la lesión en comparación con la oclusión permanente, y que si se administraba t-PA durante ese tiempo aparecía TH (Ishiguro et al., 2010).

Aunque la reperusión tardía y la administración de t-PA provocan, si acaso, hemorragias moderadas, éstas pueden agravarse si los animales de experimentación presentan alguno de los factores de riesgo de TH. De este modo, la hipertensión (empleando ratas espontáneamente hipertensas (Crumrine et al., 2011)), la obesidad (McColl et al., 2010), el tratamiento anticoagulante previo (Pfeilschifter et al., 2012) y la diabetes (hiperglucemia por inyección de glucosa o dextrano (Hu et al., 2011)) han mostrado que agravan los sangrados empleando el modelo intraluminal.

Las ventajas de este modelo son que ha sido ampliamente estudiado y que es fácil de realizar y no requiere craniectomía, lo que quiere decir que la sangre encontrada en el cerebro no provienen de la cirugía sino que se ha extravasado. No obstante, su principal inconveniente es la elevada mortalidad, especialmente cuando la reperusión no es temprana, hecho que parece contraindicar el uso de este modelo para el estudio de la TH. Además, algunos autores desaconsejan este u otros modelos mecánicos (ligadura distal de la ACM), al menos cuando se reabre el vaso ocluido, puesto que la reperusión mecánica es brusca y puede estar disparando mecanismos de daño no isquémicos (Hossmann, 2012). Por el contrario, la oclusión permanente o la reperusión lenta típica de los modelos tromboembólicos se asemeja mucho más a lo que ocurre en la clínica. Sin embargo, este modelo podría ser aún válido para estudiar las trombectomías, intervenciones para retirar el coágulo que se realizan cada vez con más

frecuencia a los pacientes de ictus que no son aptos para la terapia trombolítica o para aquellos en los que no se logra la reperfusión tras la administración de t-PA (30-40%).

4.3.2. TH en los modelos de oclusión tromboembólica

Una variación del modelo intraluminal consiste en alojar un coágulo preformado en la base de la ACM en lugar de un filamento, accediendo de igual manera a través de la carótida externa y avanzando por la interna hasta el polígono de Willis. Este modelo, conocido como modelo tromboembólico o de sangre autóloga, ha sido empleado en rata (Busch et al., 1997), ratón (Zhang et al., 1997b), conejo (Lapchak et al., 2000), gato (Yamaguchi et al., 2000) y primates (Kito et al., 2001). La reperfusión puede ocurrir de forma espontánea o bien lograrse administrando t-PA, simulando muy bien la situación clínica.

Existen indicios de que este modelo produce hemorragias espontáneas hasta en un 20% de casos (Zhang et al., 1997a; Lapchak et al., 2000), aunque la reperfusión con t-PA, incluso sólo 60 min tras la isquemia, aumentaría este porcentaje (Lapchak et al., 2000; Niessen et al., 2002). No obstante, estos sangrados son de pequeño tamaño y asintomáticos, hecho que también se observa en clínica, donde la reperfusión temprana, que rescata parte del tejido comprometido y reduce los síntomas manifestados, se asocia a un aumento de hemorragias petequiales (Molina et al., 2002).

De nuevo, la trombolisis tardía con t-PA 4 (Zhang et al., 2005) o 6 h (Copin and Gasche, 2008) tras la isquemia no sólo no reduce el tamaño de la lesión, sino que, además, aumenta las complicaciones hemorrágicas. También algunos factores de riesgo como la hipertensión (Asahi et al., 2000) o la diabetes (inducida con estreptozotocina (Fan et al., 2012)) han mostrado que favorecen la TH.

Hace 10-15 años, cuando la TH surgió como un importante tema de estudio, este modelo era ampliamente aceptado por simular bien la situación clínica, especialmente de los ictus cardioembólicos, en donde un coágulo de origen cardiaco es expulsado a la circulación sistémica y acaba ocluyendo la ACM o la carótida. Estos infartos cardioembólicos presentan las tasas de reperfusión espontánea más altas (hecho observado en este modelo de isquemia) y, de hecho, muchos AITs tienen este origen. Además, este tipo de ictus es el que más fácilmente y antes recanaliza tras la administración de t-PA (Molina et al., 2004), hecho reproducido en este modelo tromboembólico, ya que la literatura no menciona fallos en la fibrinólisis. Junto a su gran semejanza a la clínica, este modelo no requiere cirugía cerebral, por lo que las

hemorragias se deben sólo a extravasación. Así, parece la mejor aproximación para estudiar de forma experimental el fenómeno de la TH, pero la principal limitación es que, al ocluir la base de la ACM, los infartos son de gran tamaño, lo que dispara la mortalidad al 50%.

4.3.3. TH en otros modelos de isquemia

Descartados otros modelos de isquemia focal para el estudio de la TH como los de oclusión/reperfusión mecánica (como el ya mencionado de la ligadura distal de la ACM), los vasocompresivos (por no controlar la reperfusión y ser ésta de carácter brusco), los modelos de infartos lacunares (por la escasa lesión e inexistente hemorragia) y el de electrocoagulación de la ACM (por considerarse permanente y provocar un daño irreversible a la arteria), pocos son los modelos restantes a considerar, aunque dos merecen especial mención.

El primero de ellos, el fototrombótico, consiste en la inyección de un colorante, el rosa de bengala, y en la posterior iluminación de la ACM para inducir la coagulación y la consecuente isquemia (Matsuno et al., 1993). Así, produce una lesión de pequeño tamaño situada en el córtex más medial. Este modelo ha mostrado producir TH en ratas espontáneamente hipertensas cuando se les administraba t-PA (Maeda et al., 2009), es fácil de realizar, no presenta mortalidad y, al menos en ratón, no requiere craniectomía. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes a considerar para el estudio de la TH, como una lesión endotelial exacerbada (debido a los ROS producidos cuando el colorante es iluminado para desencadenar la activación plaquetaria), y que no mimetiza lo que ocurre en el humano, puesto que la coagulación se produce en todos los vasos iluminados. Aun así, merece ser tenido en cuenta por sus enormes ventajas.

El último de los modelos, el tromboembólico *in situ* (TIS), fue originalmente descrito en 2007 y consiste en la inyección de un procoagulante en la ACM, la trombina, para inducir la isquemia (Orset et al., 2007). Orset y colaboradores mostraron que la reperfusión espontánea se producía en un 15% de casos, y que la administración temprana de t-PA conseguía la recanalización arterial y rescatar parte del tejido comprometido, reproduciendo así dos hechos clínicos. Además, al ser un modelo de infarto exclusivamente cortical, la supervivencia es muy elevada. No obstante, el principal inconveniente del modelo es que requiere craniectomía y que la arteria resulta dañada durante la inyección de trombina, aunque levemente, por lo que pueden aparecer sangrados extraparenquimales que son fácilmente detectables y excluibles.

Repasando la TH en los diferentes modelos de isquemia (**Tabla 5**), parece clara la cuestión de que la recanalización tardía con t-PA podría también producir TH en el modelo TIS y constituir una buena aproximación para el estudio de este fenómeno. Precisamente, la puesta a punto de este modelo de TH es la primera parte de la presente tesis doctoral.

Tabla 5. Modelos de isquemia experimental con TH.

| Modelo | Especie | Reperf. | t-PA | Otros | Cita |
|-----------------|---------|----------|-------|-----------|-----------------------------------|
| Intraluminal | Rata | 3-6 h | No/Si | | (Pfefferkorn and Rosenberg, 2003) |
| Intraluminal | Rata | 1,5-3 h | Si | | (Strbian et al., 2007) |
| Intraluminal | Rata | 2 h | No | Hiperglu. | (Hu et al., 2011) |
| Intraluminal | Ratón | 6 h | Si | | (Ishiguro et al., 2010) |
| Intraluminal | Ratón | 40 min | No | Obesidad | (McColl et al., 2010) |
| Intraluminal | Ratón | 3 h | No | Anticoag. | (Pfeilschifter et al., 2011) |
| Intraluminal | Ratón | 3 h | Si | Anticoag. | (Pfeilschifter et al., 2012) |
| Ligadura | Rata | 6 h | Si | SHR | (Crumrine et al., 2011) |
| Sangre autóloga | Rata | No | No | | (Zhang et al., 1997a) |
| Sangre autóloga | Rata | 1 h | Si | | (Niessen et al., 2002) |
| Sangre autóloga | Rata | 4 h | Si | | (Zhang et al., 2005) |
| Sangre autóloga | Rata | 6 h | Si | | (Copin and Gasche, 2008) |
| Sangre autóloga | Rata | No/1,5 h | No/Si | Diabetes | (Fan et al., 2012) |
| Sangre autóloga | Rata | 6 h | Si | SHR | (Asahi et al., 2000) |
| Sangre autóloga | Conejo | No/1 h | No/Si | | (Lapchak et al., 2000) |
| Fototrombótico | Rata | 3 h | Si | SHR | (Maeda et al., 2009) |

Cuando aparecen varias opciones (como No/Si o No/1,5 h) indica que en el estudio se compararon ambos grupos de tratamiento.

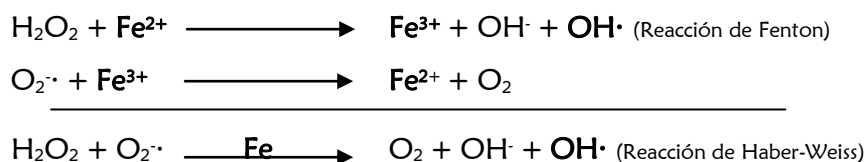
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas.

5. EL HIERRO EN EL ORGANISMO

El hierro es un elemento esencial para la vida porque es muy abundante en la naturaleza y porque presenta una doble naturaleza rédox. Por ello, la evolución lo ha escogido como el catalizador básico de multitud de procesos de oxido-reducción o transferencia electrónica. Se encuentra participando en procesos tan ligados a la vida como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, la síntesis de DNA, el metabolismo de xenobióticos o el transporte de oxígeno en la sangre. Además, es constituyente, cofactor o catalizador de proteínas tan conocidas como los citocromos, las oxigenasas, las

flavoproteínas, las redoxinas o la hemoglobina (MacKenzie et al., 2008; Pantopoulos et al., 2012) .

Paradójicamente, su divalencia en el estado de oxido-reducción entre hierro Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico) no sólo hace que participe en reacciones fundamentales para la vida, sino que también lo hace tóxico para el organismo. El hierro libre suele encontrarse en su forma reducida, como Fe^{2+} , que es muy reactivo y puede generar ROS que, a su vez, provocan un daño oxidativo en los componentes celulares. Mediante la reacción de Fenton, el hierro ferroso reacciona con H_2O_2 para oxidarse a Fe^{3+} y generar OH^- y OH^\bullet (radical hidroxilo), que es una de las ROS más dañinas. La segunda de las reacciones de Haber-Weiss recupera el Fe^{3+} (Hentze et al., 2004).



Por ello, niveles excesivamente altos de hierro pueden ser lesivos, pero también niveles muy bajos traen fatales consecuencias. Así, el proceso evolutivo ha favorecido que se desarrollen mecanismos homeostáticos que controlen estrictamente los niveles de hierro y de hierro libre en el organismo. Durante la última década se han identificado las principales proteínas que intervienen en el metabolismo del hierro y actualmente los estudios se centran en conocer los mecanismos que lo regulan (para revisión ver (Hentze et al., 2004; MacKenzie et al., 2008; Pantopoulos et al., 2012)).

5.1. METABOLISMO DEL HIERRO

La mayor parte del hierro de nuestro organismo se encuentra en el grupo hemo de la hemoglobina, interviniendo en el transporte de oxígeno que llevan a cabo los glóbulos rojos. Por ello, de los 25 mg que se necesitan diariamente para la eritropoyesis y otras funciones, casi todo el hierro procede del reciclaje de los eritrocitos por los macrófagos. Sólo entre 1-2 mg son captados de la dieta por los enterocitos del intestino y sirven para suplir al que se pierde por la desescamación de la piel y por los sangrados. Además, no existe un sistema de secreción activo para el hierro en el organismo, por lo que la regulación de sus niveles se realiza controlando la captación intestinal (MacKenzie et al., 2008).

Estos dos tipos celulares, macrófagos y enterocitos, serán responsables de liberar hierro a la sangre cuando el organismo lo requiera, o de almacenarlo y evitar su toxicidad cuando no sea necesario. Los hepatocitos constituyen la tercera célula clave en el metabolismo del hierro (**Figura 11**), ya que constituyen un sensor capaz de captar y almacenar el exceso del hierro sistémico, sintetizan las proteínas que van a transportarlo en sangre e inducen la liberación y absorción en el intestino de dicho ión en condiciones de carencia.

5.1.1. Absorción intestinal del hierro

El hierro absorbido en el intestino puede tener dos orígenes, hemo o no-hemo. El grupo hemo es captado por el enterocito a través de la proteína transportadora de hemo-1 y degradado por la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1), liberándose Fe^{2+} al citosol (Shayeghi et al., 2005).

En la dieta, el hierro no-hemo se encuentra mayoritariamente libre, en su forma férrica, y para pasar al enterocito ha de ser primero reducido a hierro ferroso, acción que parece desempeñar el citocromo b1 duodenal. Una vez como Fe^{2+} , pasa al interior celular mediante el **transportador de metales divalentes 1 (DMT-1)** (Abboud and Haile, 2000) (**Figura 11A**).

Si bien parece que el hierro proveniente del grupo hemo es el más fácilmente asimilable, la expresión de DMT-1 se induce notablemente ante la carencia de dicho ión, aumentando entonces la importancia del mecanismo no-hemo dependiente (Canonne-Hergaux et al., 1999).

5.1.2. Reciclaje de los glóbulos rojos

Como ya se ha dicho, la mayoría del hierro que se requiere diariamente proviene del reciclaje de las células rojas. Esta acción la llevan a cabo los macrófagos (**Figura 11C**) que van a fagocitar los eritrocitos viejos y dañados y que, además, presentan en su superficie un receptor carroñero, CD163, que capta directamente la hemoglobina (Kristiansen et al., 2001). En cualquier caso, la hemoglobina es degradada en los lisosomas, donde la enzima HO-1 metaboliza el grupo hemo y libera el hierro ferroso.

Finalmente, Fe^{2+} sale al citoplasma por el **DMT-1**. En este caso, este transportador no se encuentra en la membrana plasmática como en el enterocito, sino que su

localización es vesicular. Sin embargo, su función es muy similar: permitir la entrada de hierro al citosol, aunque en este caso desde el lisosoma.

Una vez en el interior de estos dos tipos celulares, enterocitos y macrófagos, el destino del hierro dependerá de la demanda del organismo (**Figura 11B y C**):

- Si hay demanda: será expulsado hacia el torrente circulatorio. Esta acción la realiza la **ferroportina (FPN)**, que une Fe^{2+} en el lado citoplasmático y lo libera al exterior tras haber sido oxidado a Fe^{3+} por la hefastina en los enterocitos o ceruloplasmina en macrófagos.
- Si no hay demanda: será almacenado en la **ferritina** al tiempo que se produce la internalización de FPN. Cuando vuelva a requerirse hierro, la ferritina será degradada en los lisosomas y el hierro será exportado de nuevo al torrente circulatorio.

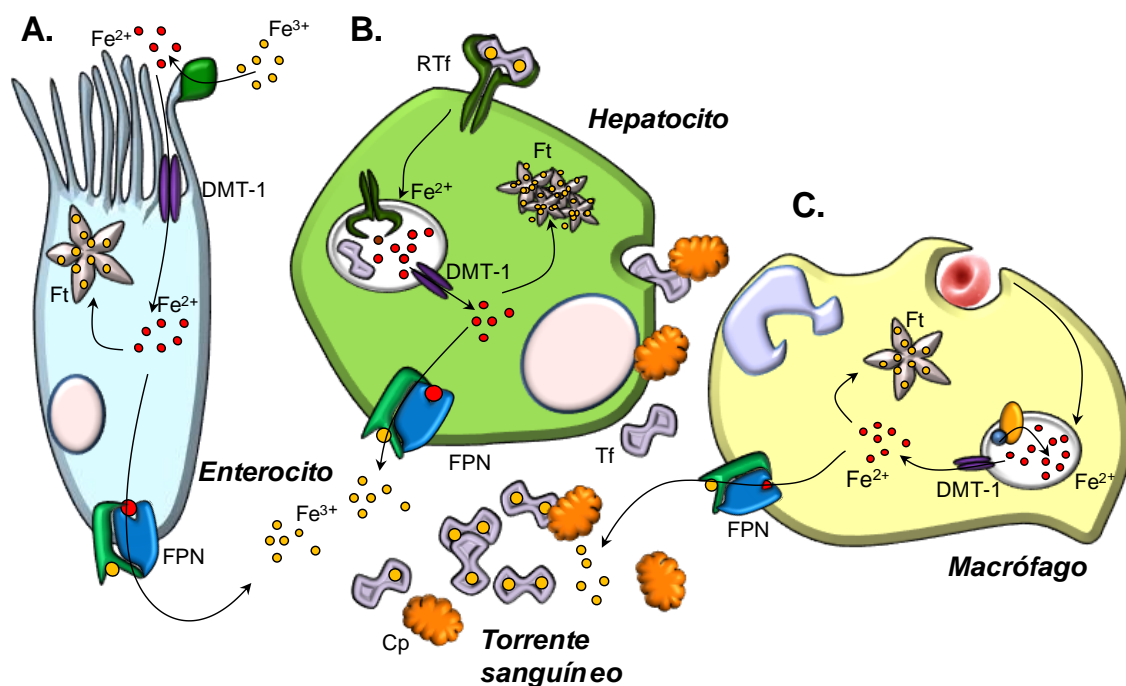


Figura 11. Metabolismo del hierro en el organismo. **A.** Absorción intestinal en el enterocito, donde el transportador de metales divalentes internaliza el hierro que será almacenado en la ferritina o exportado a la sangre por la FPN según las necesidades del organismo. **B.** Síntesis de ceruloplasmina y transferrina por el hígado, que mantienen el hierro sanguíneo secuestrado y en su estado oxidado. Esta célula también almacena el exceso de hierro en el organismo, liberándolo cuando se requiere. **C.** Reciclaje de los glóbulos rojos por los macrófagos, donde la hemooxigenasa libera el hierro de la hemoglobina y las mismas proteínas lo liberan a la sangre o lo almacenan según los requerimientos.

5.1.3. Transporte del hierro en la sangre: la transferrina

Una vez en el plasma, dos proteínas se encargan de que el hierro permanezca en su forma Fe^{3+} , que es la menos reactiva. La primera de ellas es la **ceruloplasmina**, sintetizada por los hepatocitos y conocida por ser la principal proteína transportadora de cobre. Interviene también en el metabolismo del hierro realizando funciones de ferroxidasa, manteniendo el hierro oxidado. Sin embargo, el Fe^{3+} resulta insoluble, por lo que una segunda proteína, la **transferrina (Tf)**, es la responsable de que el hierro llegue a todas las células a través del sistema circulatorio (**Figura 11B**).

La Tf es una glicoproteína de una sola cadena sintetizada y secretada también por el hígado. Presenta dos sitios de unión a hierro, pudiendo unirse 1 o 2 átomos de Fe^{3+} por molécula (Aisen et al., 1978). Su principal acción es transportar el hierro en la sangre y hacerlo llegar a todas las células del organismo.

5.1.4. Captación celular del hierro: el receptor de la transferrina

Todas las células del organismo captan el hierro del torrente circulatorio de la misma forma: el **receptor de la transferrina 1 (TfR1)** une el complejo Fe^{3+} -Tf y lo internaliza mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El TfR1 es un homodímero con 3 dominios por cadena que se internaliza en vesículas de clatrina tras unir 2 moléculas de Fe^{3+} -Tf. Una vez en el endosoma, la Tf sufre un cambio de conformación debido al pH ácido que provoca la salida del Fe^{3+} del complejo. Finalmente y tras la reducción a su forma ferrosa, el hierro pasa al citoplasma por el **DMT-1**, mientras que la Tf y el TfR1 son reciclados a la membrana.

Existe un segundo tipo de receptor, el **TfR2**, que se expresa básicamente en los hepatocitos y en los enterocitos (Kawabata et al., 1999). Presenta una menor afinidad por Fe^{3+} -Tf que TfR1 y su función no parece ser captar hierro, sino regular los niveles de dicho elemento. Mientras que una menor expresión de TfR1 provoca bajos niveles de hierro en el organismo -su deficiencia resulta letal (Levy et al., 1999)-, la de TfR2 lleva al desarrollo de hemocromatosis (Camaschella et al., 2000), trastorno causado por los altos niveles de hierro en el organismo.

Por último, existen mecanismos de captación de hierro no unido a Tf (NTBI) que, en general, son muy minoritarios pero que, en el SNC, tienen gran importancia, como se detallará posteriormente.

5.1.5. Almacenamiento del hierro: la ferritina

Todo el hierro que llega a la célula y que no va a ser utilizado se almacena en la **ferritina**. Además, el exceso de este elemento en el organismo será captado por el hepatocito mediante endocitosis mediada por TfR1 y almacenado también en la ferritina de las células hepáticas. La acción de esta proteína es siempre dual, puesto que no sólo almacena hierro, sino que también convierte el escaso Fe^{2+} que pueda haber en el citoplasma a Fe^{3+} , impidiendo que realice sus acciones tóxicas. Cuando haya escasez de dicho ión, la ferritina se degradará en el proteasoma o por autofagia en el lisosoma.

Esta proteína es, por lo tanto, fundamental en el metabolismo del hierro. Aparece muy pronto en la filogenia, estando presente en bacterias, plantas y animales. En los vertebrados se expresa en el citoplasma de todos los tipos celulares, existiendo además dos formas menos conocidas, la ferritina mitocondrial y la sérica. Está formada normalmente por 24 subunidades que se disponen en forma esférica, dejando un núcleo hidrofóbico, que es donde se almacenan hasta 4500 átomos de hierro (MacKenzie et al., 2008). Las subunidades pueden ser de dos tipos diferentes (**Figura 12**):

- **La ferritina H (*heavy*)**: aparece en toda la filogenia y presenta un dominio ferroxidasa, que une Fe^{2+} y lo oxida a Fe^{3+} , el cual se transfiere al núcleo de la macromolécula para su almacenamiento (Lawson et al., 1989).
- **La ferritina L (*light*)**: Aparece en los vertebrados y queda codificada por un gen diferente al de la forma H. Expone residuos ácidos en el núcleo, lo que facilita el almacenamiento del hierro y aumenta la eficacia de la ferritina H (Arosio and Levi, 2002).

Ambas subunidades se combinan en proporciones diferentes según el tipo celular para formar el complejo multimérico. La subunidad L es más abundante en la ferritina de órganos que almacenan hierro (hígado y bazo) y la H en órganos que utilizan mucho hierro (corazón, riñón y páncreas).

Existe una forma, la **m-ferritina**, que es mitocondrial, donde se concentra la mayoría del hierro metabólicamente activo para la cadena transportadora de electrones. Se asemeja mucho a la ferritina H y, además de almacenar hierro, se supone que desempeña una acción fundamental en la protección frente a las ROS (Langlois d'Estaintot et al., 2004).

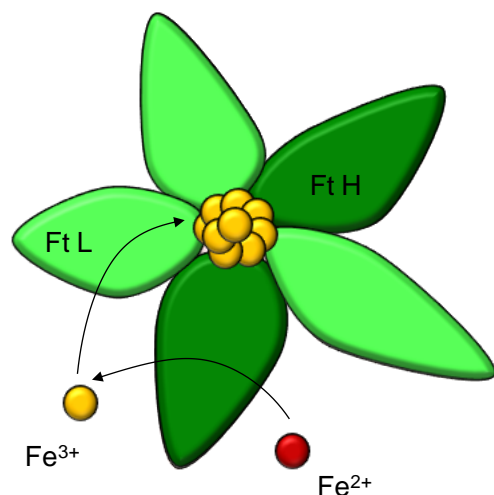


Figura 12. Estructura y funcionamiento de la ferritina, en donde se muestran los dos tipos de subunidades de la proteína: la ferritina H que es una ferroxidasa y la ferritina L que almacena el hierro oxidado en el centro hidrofóbico.

También existe la **ferritina sérica**, sintetizada y liberada por el hígado que sigue almacenando hierro. Generalmente constituye un buen marcador de los niveles de hierro en el organismo, por lo que se ha empleado en clínica para el diagnóstico de algunas enfermedades como la hemocromatosis (Prieto et al., 1975). Su función no se conoce bien, aunque se especula con la posibilidad de que tenga propiedades antiinflamatorias, ya que se ha visto que la ferritina sérica y tisular se elevan durante la inflamación, o antibacterianas como quelantes de hierro como la lactoferrina. También se supone que puede ser captada por algún receptor desconocido por algunos tipos celulares, como los precursores eritroides, células cerebrales o linfocitos B y T, desempeñando así una función que va más allá del puro almacenamiento.

5.2. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO

Debido a la importancia del hierro y a que tanto su exceso como su defecto conllevan consecuencias desastrosas para el organismo, los niveles de dicho elemento se encuentran finamente regulados por un conjunto de mecanismos redundantes y muy complejos. Estos mecanismos controlan la degradación proteica, la traducción y la transcripción de las principales proteínas del metabolismo de este elemento.

5.2.1 Regulación de la transcripción

Todas las células del organismo captan hierro mediante el sistema Tf-TfR. Por ello, ante situaciones de carencia de hierro, como en hipoxia, ambas proteínas se inducen. Esta acción queda mediada por el HIF-1 en la célula isquémica, que actúa sobre los HRE

y aumenta la transcripción de dichos genes (Lok and Ponka, 1999), facilitando la captación de hierro (para revisión ver (Peyssonnaud et al., 2008)).

Por el contrario, existen determinadas circunstancias en las que el hierro libre aumenta, como en la inflamación, lo que induce la formación de ROS. Para paliar los efectos negativos del hierro libre se requiere que se encuentre quelado en su forma no reactiva, acción de la que se encarga la ferritina. Por ello, en respuesta a la inflamación, aumenta la transcripción de los genes de la ferritina H y L (para revisión ver (Weiss, 2005)), ya que responden a citoquinas a través de NF- κ B (Kwak et al., 1995). Además, dichos genes también presentan elementos de respuesta antioxidante (AREs), induciéndose en condiciones de estrés oxidativo (Tsuji et al., 2000; Hintze and Theil, 2005).

Otras proteínas del metabolismo del hierro también regulan su expresión mediante estos tres mecanismos detallados (isquemia, estrés oxidativo e inflamación), pero de manera más limitada o menos importante.

5.2.2. Regulación de la traducción: Las IRP y el control de los niveles locales de hierro

La maquinaria biosintética de la célula es capaz de coordinar la síntesis de varias proteínas del metabolismo del hierro según los niveles locales de dicho elemento. Este control asegura una respuesta adecuada al entorno y resulta fundamental en los tres tipos celulares que regulan los niveles sistémicos de hierro: los enterocitos, los macrófagos y los hepatocitos, así como en todas las células del organismo (para revisión ver (Wang and Pantopoulos, 2011)). Es llevado a cabo por unas proteínas citoplasmáticas, llamadas **proteínas reguladoras del hierro (IRP-1 y 2)**, que detectan niveles bajos de este elemento en la célula, uniéndose a secuencias concretas no codificantes del mRNA llamadas **elementos de respuesta al hierro (IREs)** (para revisión ver (Eisenstein, 2000; Anderson et al., 2012)). Estas secuencias se encuentran en los transcritos de genes implicados en la absorción (DMT-1, TfR), liberación (FPN) y almacenamiento del hierro (ferritina), así como en otros implicados en la síntesis del grupo hemo (sintasa del ácido δ -aminolevulínico (Cox et al., 1991)), en la respuesta a hipoxia (HIF-2 α (Zimmer et al., 2008)), en la génesis de poder reductor (aconitasa mitocondrial (Zheng et al., 1992)) que es indispensable para mantener las defensas antioxidantes de la célula e, incluso, en la proteína precursora de β -amiloide (APP) (Rogers et al., 2008) que se acumula en la enfermedad de Alzheimer. Las secuencias IRE

se encuentran en dos localizaciones diferentes del mRNA y, según sea ésta, la unión de IRP causará un efecto u otro (Casey et al., 1988) (**Figura 13**):

- Si IRE está en **3'**, donde se encuentra la cola de poliadenina, la unión de IRP estabiliza el mensajero ante las bajas concentraciones de hierro, aumentando la síntesis proteica. Ocurre en los casos de TfR y DMT-1, lo que favorece la captación de hierro y su liberación al citosol.
- Si IRE está en **5'**, donde se encuentra la caperuza GTP, la unión de IRP cuando hay poco hierro impide el reconocimiento del mRNA por parte del ribosoma, lo que disminuye la síntesis proteica. Ocurre en los casos de la ferritina, FPN, HIF-2 α , ALAs y aconitasa mitocondrial, lo que impide el almacenamiento o liberación de hierro cuando hay escasez, al tiempo que se impide la formación del grupo hemo y de un exceso de poder reductor.

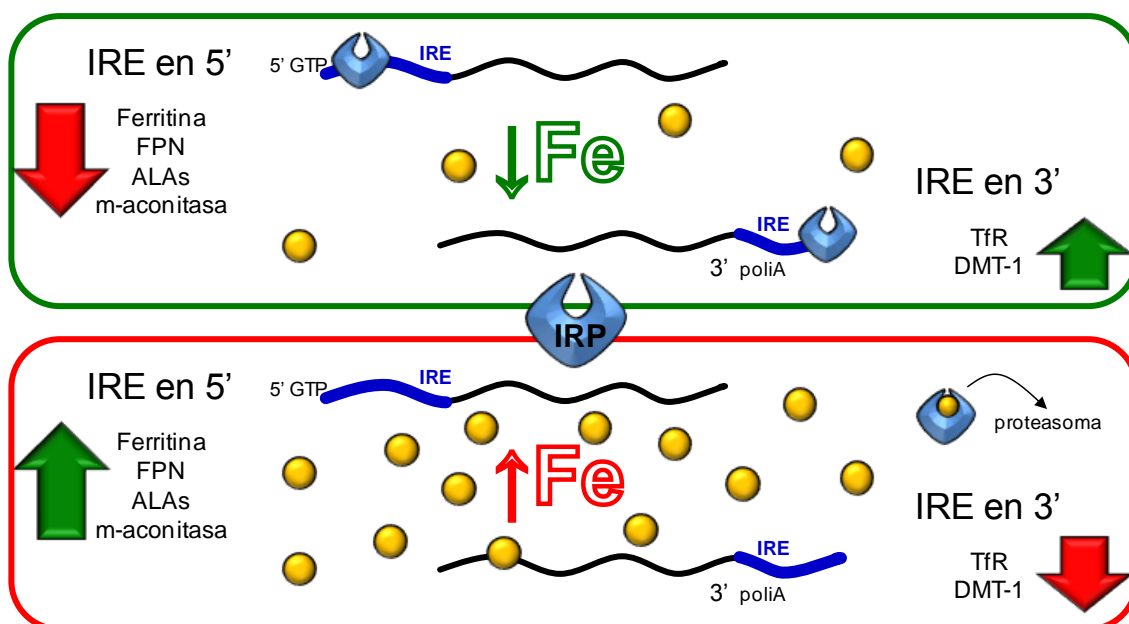


Figura 13. Regulación de la traducción según los niveles locales de hierro. Cuando hay poco hierro en la célula, IRP se une a los IREs presentes en los mRNA de proteínas del metabolismo del hierro. Si la secuencia se encuentra en 5', se produce la inhibición de la traducción (ferritina y FPN) pero, si se encuentra en 3', se potencia (TfR y DMT-1). Cuando aumentan los niveles locales de hierro se unen a IRP y se degrada en el proteasoma.

La mayoría de las secuencias IRE, sea cual sea su localización, son diana de ambas IRP1 y 2, pero también existen algunas a las que se une exclusivamente una de las dos proteínas reguladoras. Las diferencias entre ambas son aún mayores: IRP1 no sólo

responde a los niveles bajos de hierro, sino que las ROS y las RNS también son capaces de activarla, igual que la hipoxia (Anderson et al., 2012). Sin embargo, IRP2 parece activarse por mecanismos dependientes exclusivamente de los niveles bajos de hierro.

Por último, cuando los niveles de hierro son altos, estas proteínas unen hierro y dejan de funcionar como IRPs. Mientras que IRP2 es ubiquitinizada y degradada por el proteasoma (Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009), IRP1 pasa a tener una función enzimática, siendo la aconitasa citosólica (Rouault et al., 1991). Así, al no unirse ya a los mRNA, disminuye la síntesis de TfR y DMT-1 y aumenta la de ferritina, ferroporina, ALAs y aconitasa mitocondrial (**Figura 13**), impidiéndose una mayor captación de este elemento en condiciones de exceso y favoreciéndose su almacenamiento y liberación.

5.2.3. Regulación de los niveles sistémicos de hierro: la hepcidina

El hígado es el órgano clave del metabolismo del hierro. No sólo sintetiza las proteínas plasmáticas que lo mantienen quelado y que aseguran el aporte a todas las células (ceruloplasmina y Tf), o capta los excesos de hierro y los almacena sino que, además, regula las concentraciones sistémicas de este elemento mediante una hormona, la **hepcidina**. Esta hormona de naturaleza proteica (25-30 aminoácidos) se sintetiza en el hígado en respuesta a niveles altos de hierro. Actúa sobre los tres principales tipos celulares que aportan hierro a la sangre (enterocitos, macrófagos y los propios hepatocitos) uniéndose a la FPN y facilitando su internalización y degradación (Nemeth et al., 2004) (**Figura 14**). Así, disminuye la liberación de hierro al torrente sanguíneo y se coordina la acción de varios tipos celulares según las necesidades del organismo (para revisión ver (Anderson et al., 2009; Ganz and Nemeth, 2012)). Por lo tanto, la hepcidina constituye la pieza maestra de la regulación del metabolismo del hierro.

La síntesis de esta hormona se regula por los depósitos de hierro (Pigeon et al., 2001), inflamación, hipoxia y tasa de eritropoyesis (Nicolas et al., 2002). Estos diferentes mecanismos implican a proteínas como TfR2, la proteína de hemocromatosis hereditaria (HFE) y la hemojuvelina. Mutaciones en cualquiera de ellas, en la FPN o en la propia hepcidina hacen que el organismo siga absorbiendo hierro, incluso aunque ya haya un exceso, ocasionando su acumulación, daño tisular por estrés oxidativo y disfunción orgánica (para revisión ver (Pietrangelo, 2010)). Este trastorno se conoce como **hemocromatosis** y se diagnostica por una elevación de la ferritina sérica y de la saturación de la Tf (EASL, 2010). Es una enfermedad tremendamente heterogénea,

siendo más o menos grave según la proteína mutada. Así, en la forma juvenil está alterada la hepcidina o la hemojuvelina, se manifiesta a edades tempranas y cursa con una clínica más grave. La forma clásica de la enfermedad, casi siempre debida a mutaciones en HFE, se manifiesta más tardíamente y con una clínica menos acusada. Su importancia radica en que determinados polimorfismos de esta proteína son altamente prevalentes en la población (EASL, 2010), como H63D con un 14% o C282Y en Europa, especialmente en el Norte donde llega al 12,5% (Laine et al., 2005).

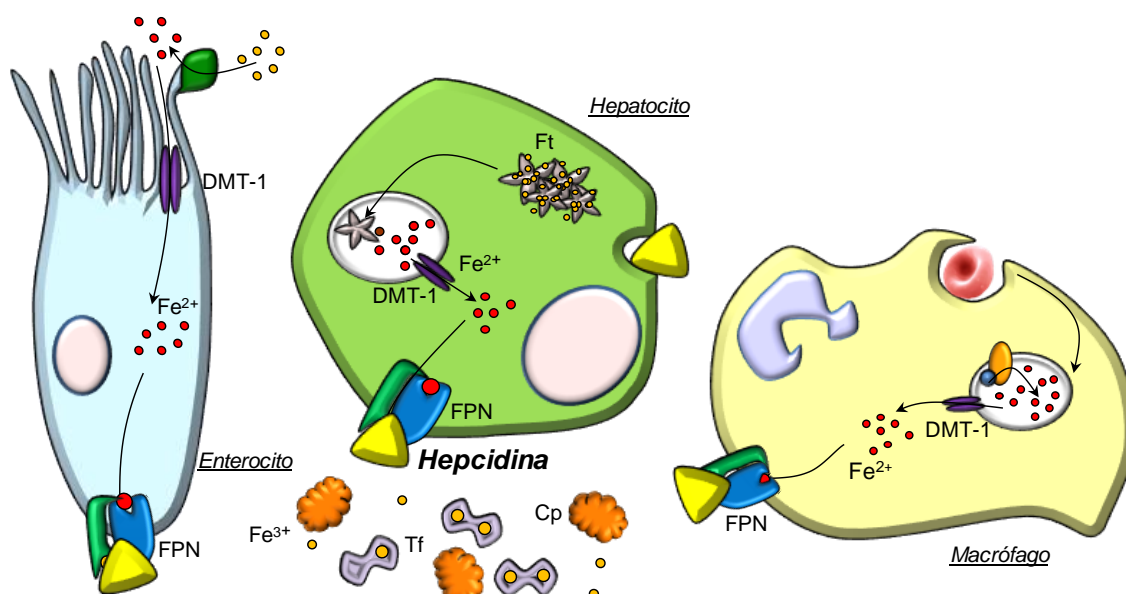


Figura 14. Regulación de los niveles sistémicos de hierro por la hepcidina. Los niveles elevados de hierro inducen la síntesis de hepcidina en el hepatocito, hormona que se une a la FPN de los tres principales tipos celulares exportadores de hierro: enterocitos, macrófagos y el propio hepatocito. Como consecuencia, la FPN se internaliza y se degrada, impidiéndose la liberación de más Fe^{3+} al torrente circulatorio.

Aunque en heterocigosis estos polimorfismos no llevan al desarrollo de la hemocromatosis, e incluso muchas veces tampoco en homocigosis, sí que podrían aumentar los niveles de hierro sin llegar a producir la patología (Olynyk et al., 1999; Sanchez et al., 2003; Adams et al., 2005). Así, ante enfermedades en las que el hierro participa en el daño tisular, estos pacientes con mayores niveles de este metal podrían ser propensos a un mayor daño tisular. Tal es el caso del ictus, razón por la que cual debe estudiarse el papel del hierro en la isquemia cerebral, si los pacientes con sobrecarga (por mutaciones altamente prevalentes) evolucionan de forma semejante y si son o no candidatos a la terapia trombolítica.

5.3. EL HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

El hierro es indispensable para el cerebro, no sólo porque es un órgano metabólicamente muy activo y participa en las reacciones de óxido-reducción que ocurren en todo el organismo, sino porque también interviene en la síntesis de neurotransmisores y de mielina. Además, determinadas estructuras cerebrales, como los ganglios basales y la *substantia nigra*, presentan concentraciones elevadas de este elemento. El SNC tiene mecanismos ligeramente diferentes a los que regulan la homeostasis del hierro en el resto de las células, razón por la cual la hemocromatosis cursa con sobrecarga de hierro en los tejidos, menos en el cerebro (Russo et al., 2004).

5.3.1. Metabolismo cerebral del hierro

El hierro llega al cerebro a través de la sangre, unido a la Tf que es captada por las células endoteliales cerebrales que expresan su receptor. Tras la endocitosis del complejo Tf-TfR, no queda claro cómo atraviesa la BHE y es liberado en el parénquima nervioso (**Figura 15**). No parece que este transporte tenga lugar como en los enterocitos, ya que el endotelio cerebral no expresa DMT-1 (Moos et al., 2006) ni FPN (Moos and Rosengren Nielsen, 2006), si bien algunos autores contradicen estas publicaciones (Siddappa et al., 2003; Wu et al., 2004). Una teoría es que el endosoma, por **transcitosis**, se fusiona con la membrana basal endotelial (para revisión ver (Moos et al., 2007)). La mayor parte de esta membrana queda en íntimo contacto con los pies astrocitarios, indispensables para que se desarrolle la BHE, que liberan sustancias de bajo peso molecular. Estas sustancias, como citrato o ATP, acidifican el medio e inducen la liberación de Fe^{3+} de la Tf, pero no de la Tf, que permanece unida a su receptor y regresa al torrente circulatorio por el mismo mecanismo de transcitosis. Otros autores proponen que el endotelio expresa DMT-1 y FPN y que, tras captar la Tf plasmática, libera el hierro en la membrana basal por el mismo mecanismo que los enterocitos (para revisión ver (Singh et al., 2013)). La ceruloplasmina del astrocito sería clave para la liberación del hierro de la FPN (Jeong and David, 2003). Incluso, podría ser que los plexos coroidales fueran clave en el transporte de hierro al parénquima cerebral al presentar la expresión más alta de DMT-1 y FPN (Rouault et al., 2009). Tampoco se descarta que el hierro entre al cerebro a través de otras proteínas, como lactoferrina o ferritina sérica.

En cualquier caso, una vez en el parénquima, el hierro difunde unido a estas pequeñas moléculas (**hierro no unido a Tf, NTBI**) que producía el astrocito o a la Tf que

produce el propio cerebro (ya que la de origen plasmático no atraviesa la BHE) y que es sintetizada en los plexos coroideos y oligodendrocitos (Bartlett et al., 1991). Lo hace en su estado +3, el que no resulta tóxico, gracias a la síntesis de ceruloplasmina por el astrocito, si bien la isoforma cerebral difiere de la hepática en que se encuentra anclada a la membrana (**Figura 15**). El NTBI es escaso en el plasma, pero en el cerebro es abundante y constituye la principal fuente de hierro, especialmente para las células gliales (Moos and Morgan, 2004). Por el contrario, las neuronas presentan TfR y DMT-1, por lo que adquieren el hierro de la Tf, pese a que también puedan captar el NTBI. Además, estas células no almacenan el exceso de hierro (presentan muy poca ferritina), sino que lo expulsan mediante la FPN. La microglía es la célula encargada de almacenar este exceso y, por lo tanto, presenta los mayores niveles de ferritina.

5.3.2. Papel del hierro en la isquemia cerebral

Como ya se ha explicado anteriormente, el hierro libre, a través de la reacción de Haber-Weiss, es capaz de producir un exceso de radicales libres, por lo que la alteración de su homeostasis cerebral podría contribuir a dañar la unidad neurovascular. Este deterioro metabólico es típico de la edad y se ha implicado en enfermedades del SNC como la ataxia de Friedreich (Puccio et al., 2001), la enfermedad de Parkinson (Kaur and Andersen, 2004), la enfermedad de Alzheimer (Bishop et al., 2002), y otras neurodegenerativas (para revisión ver (Rouault, 2013)).

La isquemia cerebral también produce una alteración de la homeostasis del hierro, contribuyendo al daño isquémico. Consiste en la liberación del Fe^{+3} de sus principales proteínas de unión tras la isquemia. Por un lado, la Tf cambia de conformación cuando hay acidosis (lo cual se produce durante la hipoxia por el desarrollo del metabolismo anaerobio), liberando el hierro en el proceso. Por otro lado, la acidosis, junto a otras moléculas típicas de la isquemia como ROS y las catecolaminas, también media el cambio a Fe^{+2} , lo que facilita su liberación de la ferritina. Millerot-Serrout y colaboradores (Millerot-Serrout et al., 2008) demostraron que este **aumento de los niveles de hierro libre** se produce 1 h tras la isquemia y afecta al tejido isquémico y al periférico, pero es transitorio, regresando rápidamente a los niveles normales. Este hierro libre está en su forma más reactiva y contribuye al daño por ROS, llevando incluso a la apoptosis celular (para revisión ver (Selim and Ratan, 2004)).

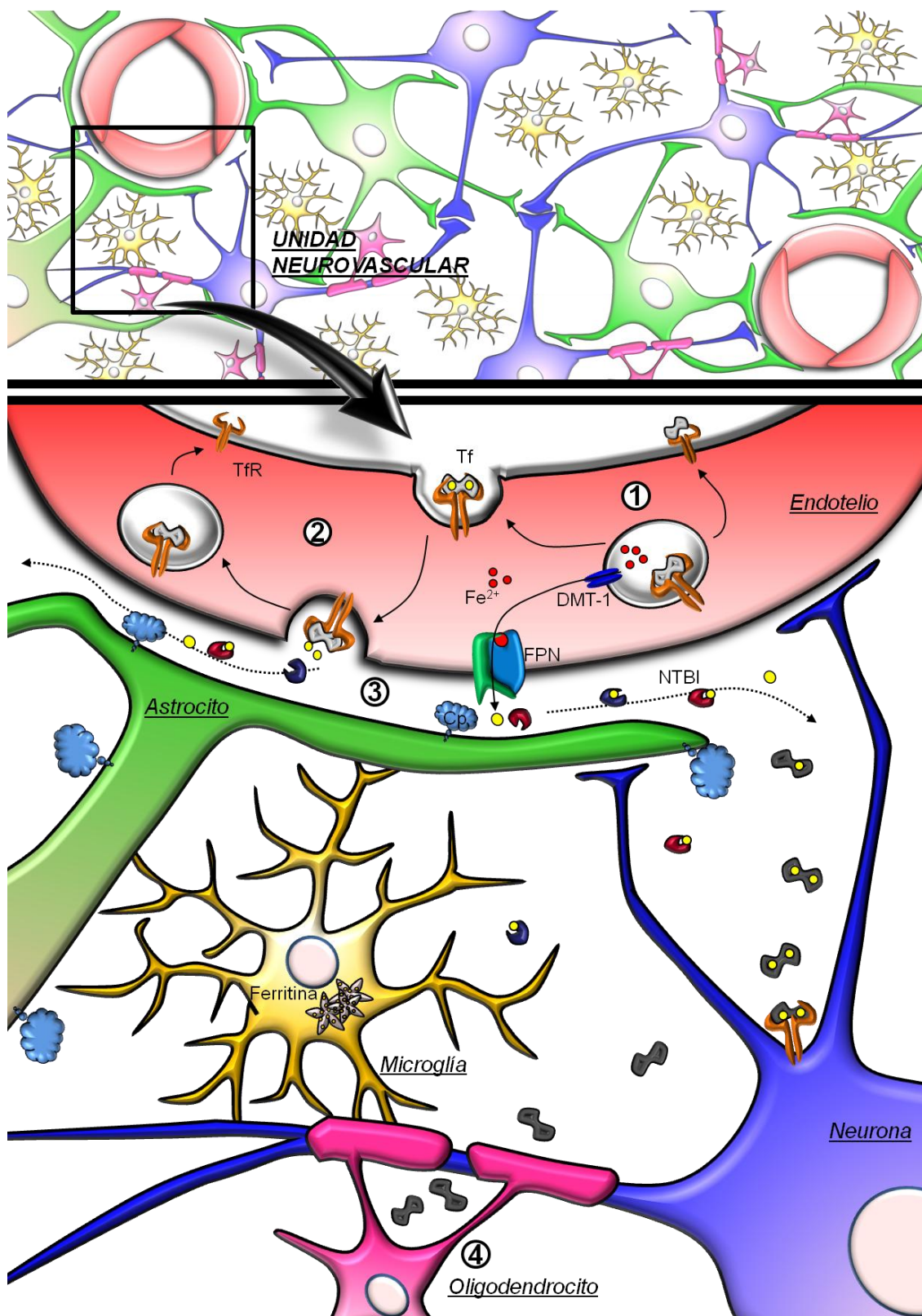


Figura 15. Metabolismo del hierro en la unidad neurovascular. El hierro, tras ser captado de la sangre por el endotelio, atraviesa la BHE bien por un mecanismo dependiente de FPN o bien por transcitosi. En cualquier caso, una vez en el otro lado, se une a pequeñas moléculas liberadas por los astrocitos o incluso a la Tf sintetizada por la oligodendroglía. Si bien el Fe-Tf será captado por las neuronas, las células gliales usarán básicamente el NTBI.

Sin embargo, no sólo se produce un aumento del hierro libre, también **aumenta el hierro total** en el cerebro. Esto parece producirse de forma temprana tras la isquemia (Palmer et al., 1999; Millerot-Serruot et al., 2008), permaneciendo elevado incluso meses tras el ictus (Kondo et al., 1995), al contrario que el hierro libre, que volvía a los niveles normales a las horas. Como consecuencia de este aumento, se produce la inducción de su principal proteína quelante, la ferritina, así como la inhibición de la proteína que lo capta, el TfR. Ambas cambian su expresión en respuesta a la isquemia (Qi et al., 1995; Ishimaru et al., 1996; Chi et al., 2000), permaneciendo alteradas bastante más allá de 8 semanas (Kondo et al., 1995; Danielisova et al., 2002). El incremento en hierro total parece localizarse en las células inmunes, principalmente en la microglía, si bien también se produce en algunas neuronas que degeneran (Kondo et al., 1995). Por este motivo, no sólo el hierro libre podría estar dañando al cerebro en las primeras horas tras la isquemia, sino que algunos estudios parecen indicar que el aumento del hierro total podría participar del daño a la unidad neurovascular durante días o semanas tras un ictus (Bishop and Robinson, 2001).

El cerebro es un órgano privilegiado por varios motivos. Uno de ellos, es que tiene tan finamente regulados los niveles de hierro que incluso en enfermedades como la hemocromatosis, en la que se producen acúmulos de este elemento en los tejidos, los niveles cerebrales de hierro se mantienen más o menos normales (para revisión ver (Nandar and Connor, 2011). Incluso, modelos animales de hemocromatosis, por sobrecarga oral o genéticos, han mostrado que el cerebro mantiene los niveles de hierro pese a que aumentan en el resto de tejidos (Crowe and Morgan, 1996; Papanastasiou et al., 2000; Castellanos et al., 2002). Por ello, llama especialmente la atención que tras la isquemia aumenten las concentraciones cerebrales de hierro. ¿De dónde procede y por qué mecanismo entra al cerebro?

Si bien aún no se ha demostrado cuál es el mecanismo por el cual el cerebro ve aumentada la cantidad de hierro en respuesta a una isquemia, parece claro que la sangre debería ser la principal fuente. Ya ha sido explicado cómo la microvasculatura y los plexos coroidales constituyen la primera barrera para la entrada de hierro al parénquima cerebral. De hecho, en la hemocromatosis, pese a que los niveles globales en el cerebro son normales, sí parecen observarse acúmulos menores en los órganos circunventriculares (Cammermyer, 1947), que carecen de BHE. Por tanto, es la presencia de esta barrera de selectividad la que parece controlar el paso del hierro, barrera que queda alterada rápidamente en respuesta a la isquemia. La apertura de la BHE podría

facilitar el paso al parénquima cerebral de proteínas que unen hierro, como la Tf o la ferritina sérica e incluso, si hay TH, de eritrocitos. De hecho, un estudio muestra como los depósitos de hierro que ocurren tras la isquemia tienen una localización perivascular (Mehta et al., 2004).

Explicada la alteración de la homeostasis del hierro tras la isquemia, ¿cuáles son las evidencias de su participación en el daño neurovascular? Desde hace más de 20 años existen numerosos estudios sobre el papel deletéreo del hierro en la isquemia cerebral. Por un lado, se ha demostrado que la adición de hierro causa muerte neuronal por estrés oxidativo tanto en cultivos (Zhang et al., 1993; Hutter-Paier et al., 1998) como *in vivo* (Bishop and Robinson, 2001). Por otro, se ha probado que los quelantes de hierro, como la deferroxamina (Patt et al., 1990; Rosenthal et al., 1992; Soloniuk et al., 1992; Palmer et al., 1994) u otros (Yamamoto et al., 1997; van der Worp et al., 1999; Demougeot et al., 2004), protegen frente al daño isquémico *in vivo*. Además, un estudio muestra que bajos niveles de hierro resultan neuroprotectores frente a la isquemia cerebral (Patt et al., 1990) y otros han probado que animales con sobrecarga de hierro experimentan un mayor daño tras ser sometidos a isquemia cerebral (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004). Incluso se ha mostrado cómo el tratamiento con un análogo de la superóxido dismutasa (una de las principales enzimas antioxidantes) revierte el daño isquémico por sobrecarga de hierro (Mehta et al., 2004).

Otro conjunto de evidencias sobre la participación del hierro en el daño isquémico son las aportadas por estudios clínicos. Un primer trabajo, de Dávalos y colaboradores (Davalos et al., 1994), clasificó un total de 67 pacientes en dos grupos, de buen o mal pronóstico, según los déficits neurológicos a los tres meses del episodio isquémico, encontrando que los niveles de ferritina sérica al ingreso, como marcador de los niveles de hierro en el organismo, se asociaban a peor pronóstico e incluso a deterioro progresivo. Dicho de otra manera, niveles altos de hierro provocaban un mayor daño isquémico. Un segundo estudio independiente del primero encontró que aquellos pacientes de ictus isquémico que presentaban un infarto progresivo, definido como deterioro neurológico entre la admisión y las primeras 48 h, tenían valores de ferritina sérica mayores al ingreso (Davalos et al., 2000). De nuevo se asociaban los mayores niveles de hierro a peor evolución tras un ictus, resultados confirmados por otros grupos (Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012). Finalmente, niveles altos de hierro también han sido asociados a peor pronóstico en pacientes que recibieron t-PA, así como a un mayor riesgo de TH (Millan et al., 2007; Choi et al.,

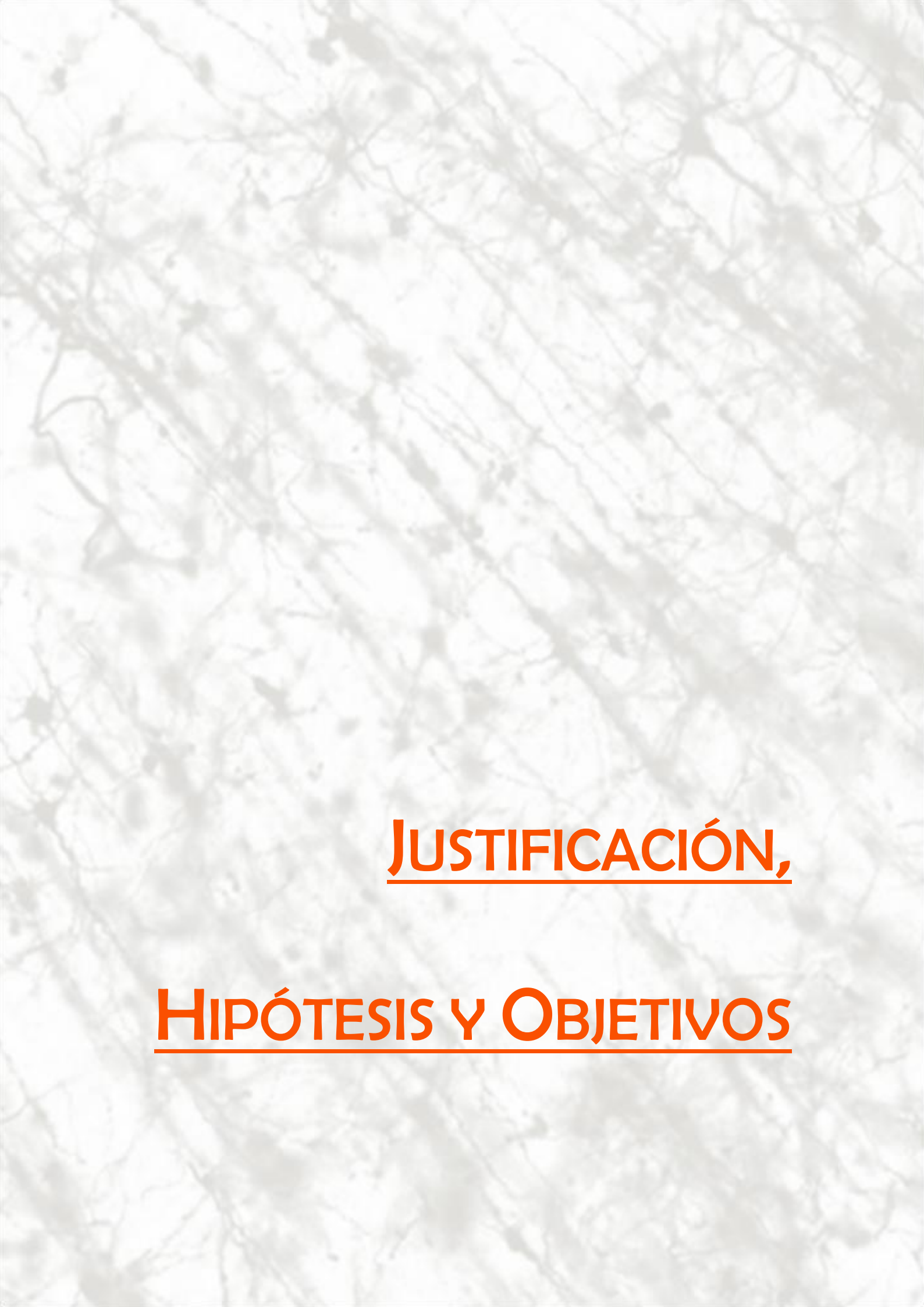
2011), principal complicación de la terapia trombolítica. Además de la ferritina sérica, otros posibles marcadores de daño isquémico y/o TH como IL-6, glutamato, MMP-9 o fibronectina celular se encontraron elevados al ingreso en pacientes de mal pronóstico, con edema grave o que presentaron hemorragia parenquimal (Millan et al., 2008).

Sin embargo, otros artículos muestran datos en contra de la participación del hierro en el ictus (Christensen et al., 2002). Un estudio experimental (Millerot et al., 2005) no pudo mostrar un mayor daño isquémico en animales con niveles altos de hierro, empleando dos modelos agudos de sobrecarga. Además, Millerot y colaboradores mostraron que la ferritina sérica podría ser un reactante de fase aguda y elevarse en las primeras 24 h tras la isquemia, dejando de ser un marcador fiable de los niveles de hierro. Este estudio pone en entredicho las evidencias clínicas sobre el efecto deletéreo del hierro ya que, en ellos, los niveles de este elemento se midieron por la ferritina sérica en admisión, es decir, horas después del comienzo del episodio isquémico, tiempo suficiente para haberse elevado si fuera una proteína de fase aguda. En este caso, la ferritina no indicaría niveles de hierro, sino gravedad del ictus. Dichos estudios clínicos podrían incluso mostrar datos que apoyaran esto, puesto que la etiología del ictus fue predominantemente aterotrombótico en los pacientes de mal pronóstico y lacunar en los de bueno (Davalos et al., 2000; Millan et al., 2007), es decir, los pacientes de mal pronóstico y elevada ferritina sérica fueron predominantemente los de infartos más grandes. Sin embargo, cabe destacar que varios estudios clínicos han descartado la elevación de la ferritina sérica de forma aguda tras un ictus (Armengou et al., 1998; Millan et al., 2007; Chakraborty et al., 2012).

Podría ocurrir que los altos niveles de hierro en el organismo predispusieran frente a un ictus o frente a un mayor daño endotelial (Kiechl et al., 1997; Duffy et al., 2001). Si a esto sumamos la participación del hierro en la isquemia cerebral y la localización perivascular de los acúmulos de hierro (Mehta et al., 2004), resulta obvio preguntarse si los pacientes con sobrecarga de hierro presentan mayor riesgo de transformación hemorrágica, sea por el daño previo o post-isquémico.

Si bien el papel de la sobrecarga de hierro en la isquémica cerebral queda aún por aclarar, sí parece lo suficientemente claro en la hemorragia cerebral, en donde la salida de sangre al parénquima cerebral conlleva la extravasación de hierro, el cual media un mayor daño como muestran algunos datos clínicos (Mehdiratta et al., 2008; Perez de la Ossa et al., 2010). Este hierro media daño por ROS contra el que los quelantes de

hierro, como la deferoxamina, podrían ser un buen tratamiento (para revisión ver (Selim, 2009)).

The background of the slide is a light-colored marbled paper with a complex, organic pattern of dark grey and black veins. The text is centered and consists of two lines, both in a bold, orange-red font and underlined.

JUSTIFICACIÓN,

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

El uso del t-PA para el tratamiento del ictus isquémico fue aprobado en 1996, al comprobarse que posibilitaba la recanalización del vaso obstruido. Hoy en día, casi 20 años después, continúa siendo el único fármaco disponible para la fase aguda del ictus. Sin embargo, su uso es muy restringido por temor a su principal efecto secundario, la TH. Si bien este fenómeno forma parte de la evolución natural del ictus, la administración de t-PA puede exacerbarlo, produciendo hemorragias extensas que comprometan la vida del paciente. Tras el fracaso de las terapias llamadas neuroprotectoras, muchos estudios actuales se centran en mejorar la terapia trombolítica para extender su uso. El objetivo es claro: disminuir la TH. Para ello se trata de identificar los pacientes más propensos a beneficiarse de la terapia trombolítica así como los más susceptibles a desarrollar sangrados.

Avanzar en el conocimiento de este proceso resulta pues indispensable, para lo que se requiere trabajar con modelos de isquemia experimental que reproduzcan la TH. Al comienzo de la realización de esta tesis doctoral muy pocos artículos describían la presencia de sangrados intracerebrales en cualquiera de los modelos de ictus, por lo que se planteó la necesidad de desarrollar un modelo de TH antes de realizar los estudios pertinentes. De entre los modelos de isquemia existentes, se seleccionó el modelo TIS, por inyección de trombina en la ACM, por ser un modelo trombótico, reperfundible por t-PA y por producir un infarto de tamaño medio que no conlleva una mortalidad elevada. Por todo ello, en una primera fase de este trabajo se abordó la puesta a punto de un modelo de TH.

Por otro lado, datos experimentales y clínicos sugieren que los niveles altos de hierro podrían agravar el daño isquémico e, incluso, favorecer la TH. Los mecanismos moleculares parecen implicar una sobreproducción de radicales libres mediada por dicho elemento que dañaría la unidad neurovascular y llevaría a una mayor muerte neuronal y a un mayor daño a la BHE. Este efecto deletéreo del hierro podría verse potenciado por los efectos tóxicos del t-PA (que es un potenciador de la excitotoxicidad y de la disrupción de BHE al inducir y activar MMP-9) particularmente si la recanalización arterial se retrasase.

2. HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo será doble:

En un modelo tromboembólico de isquemia cerebral en ratón, la recanalización arterial temprana con t-PA recupera parte del tejido comprometido mientras que la reperfusión tardía no sólo no mejora el pronóstico, sino que aumenta el riesgo de TH.

Los animales con niveles sistémicos elevados de hierro, al ser sometidos a un ictus experimental, sufren mayor estrés oxidativo y mayor daño isquémico que puede desembocar en TH si se administra t-PA, perdiéndose así el efecto beneficioso de la terapia trombolítica.

3. OBJETIVOS

- 1) Poner a punto un modelo tromboembólico de isquemia cerebral experimental en ratón.
- 2) Desarrollar TH en dicho modelo a partir de la administración tardía de t-PA.
- 3) Caracterizar molecularmente el modelo de TH.
- 4) Describir la cinética de la ferritina sérica, marcador de los niveles de hierro en el organismo, tras una isquemia experimental.
- 5) Evaluar el efecto de la sobrecarga de hierro sobre el daño isquémico.
- 6) Evaluar el efecto de la sobrecarga de hierro en la TH tras la administración de t-PA.
- 7) Estudiar posibles marcadores moleculares plasmáticos que ayuden a la identificación de los grupos más propensos a desarrollar TH.

The background of the page is a light-colored, marbled paper with a complex, organic pattern of veins and swirls in shades of grey and white.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se realizaron dos grandes bloques de experimentos: 1) el **desarrollo de un modelo de transformación hemorrágica** y 2) el **efecto de la sobrecarga de hierro en la isquemia cerebral**. El protocolo y los experimentos realizados en cada uno de ellos se detalla a continuación.

1.1. DESARROLLO DE UN MODELO DE TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

Para estudiar la TH se necesitaba desarrollar un modelo de isquemia adecuado, en el cual pudiera observarse dicho efecto. Por ello, se escogió como base el modelo **tromboembólico *in situ*** (Orset et al., 2007), consistente en la oclusión de la MCA mediante la inyección de trombina, que promueve la coagulación sanguínea. Este modelo permite la posterior recanalización mediante la administración intravenosa de t-PA, que disuelve el coágulo. La administración a tiempos tardíos del fibrinolítico podría producir hemorragia en el tejido infartado, fenómeno que se pretendía estudiar.

Para esta puesta a punto del modelo de TH se realizaron varias fases experimentales. En todas ellas los animales fueron aleatoriamente asignados a un grupo experimental y las cuantificaciones se realizaron por un investigador ciego al tratamiento.

1.1.1. Establecimiento del modelo

Uno de los problemas del modelo TIS es que pueden producirse reperfusiones espontáneas cuando el trombo se disuelve por autólisis. Es decir, el flujo sanguíneo cerebral se recupera solo, sin tratamiento con t-PA. Para evitar este problema se necesitaba obtener un coágulo estable tras la inyección de trombina pero que, al mismo tiempo permitiera una posterior recanalización con un trombolítico. Por ello, se probaron concentraciones crecientes de trombina, partiendo de la publicada en la descripción del modelo (Orset et al., 2007). Las concentraciones estudiadas fueron 0,75, 1,5 y 2 UI/ μ l (n=6, 17 y 12 respectivamente, **Figura 16A**), inyectándose siempre un volumen de 1 μ l. La oclusión adecuada de la arteria o la reperfusión espontánea se comprobaron tanto por el color del vaso como por el registro láser-doppler del flujo arterial (**Figura 17A y B**). Además del porcentaje de reperfusión espontánea durante la

primera hora, se midió el volumen de infarto tras tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio) a las 24 h de isquemia.

1.1.2. Recanalización con t-PA

Tras determinar la concentración de trombina que producía una oclusión estable, había que conseguir la reperusión arterial mediante la administración de t-PA e, incluso, lograr que se produjera el fenómeno de la TH. Según la literatura (para revisión ver (Rha and Saver, 2007)), la recanalización temprana con t-PA disminuye el infarto, pero la tardía podría aumentar el daño a la BHE y, por lo tanto, el sangrado. Para comprobar esta hipótesis se administró salino o t-PA (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Alemania) a los 20 min o a las 3 h de la oclusión. La dosis empleada de trombolítico fue de 10 mg/kg, en un volumen máximo de 200 μ l. Se escogió esta dosis, 10 veces superior a la que se utiliza en clínica, porque el t-PA es de origen humano y su actividad sobre el plasminógeno de ratón es 10 veces menor que sobre el plasminógeno humano (Korninger and Collen, 1981). Además, es la dosis utilizada en publicaciones anteriores (Busch et al., 1997; Wang et al., 2003; Orset et al., 2007).

Los animales se agruparon en cinco grupos experimentales (**Figura 16B**) atendiendo al tratamiento (salino o t-PA a los 20 min o a las 3 h) y a la reperusión o no reperusión de la arteria (**Figura 17**). Los tres primeros son los de más interés por ser los que responden al tratamiento:

- **MCAO**: (n=13) Grupo de isquemia permanente, tratado con salino a los 20 min de la oclusión arterial.
- **tPA 20min**: (n=10) Grupo tratado y reperfundido con t-PA a los 20 min de la oclusión.
- **tPA 3h**: (n=8) Grupo tratado y reperfundido con t-PA a las 3 h de la oclusión.
- **Reperusión Espontánea (Rep Esp)**: (n=6) Grupo con recanalización completa en la primera hora de isquemia sin haber recibido tratamiento trombolítico. Se excluyeron las recanalizaciones parciales.
- **No reperusión (No Rep)**: (n=15) Grupo tratado con t-PA a los 20 min o a las 3 h de la oclusión pero que no reperfundió durante la primera hora tras el tratamiento.

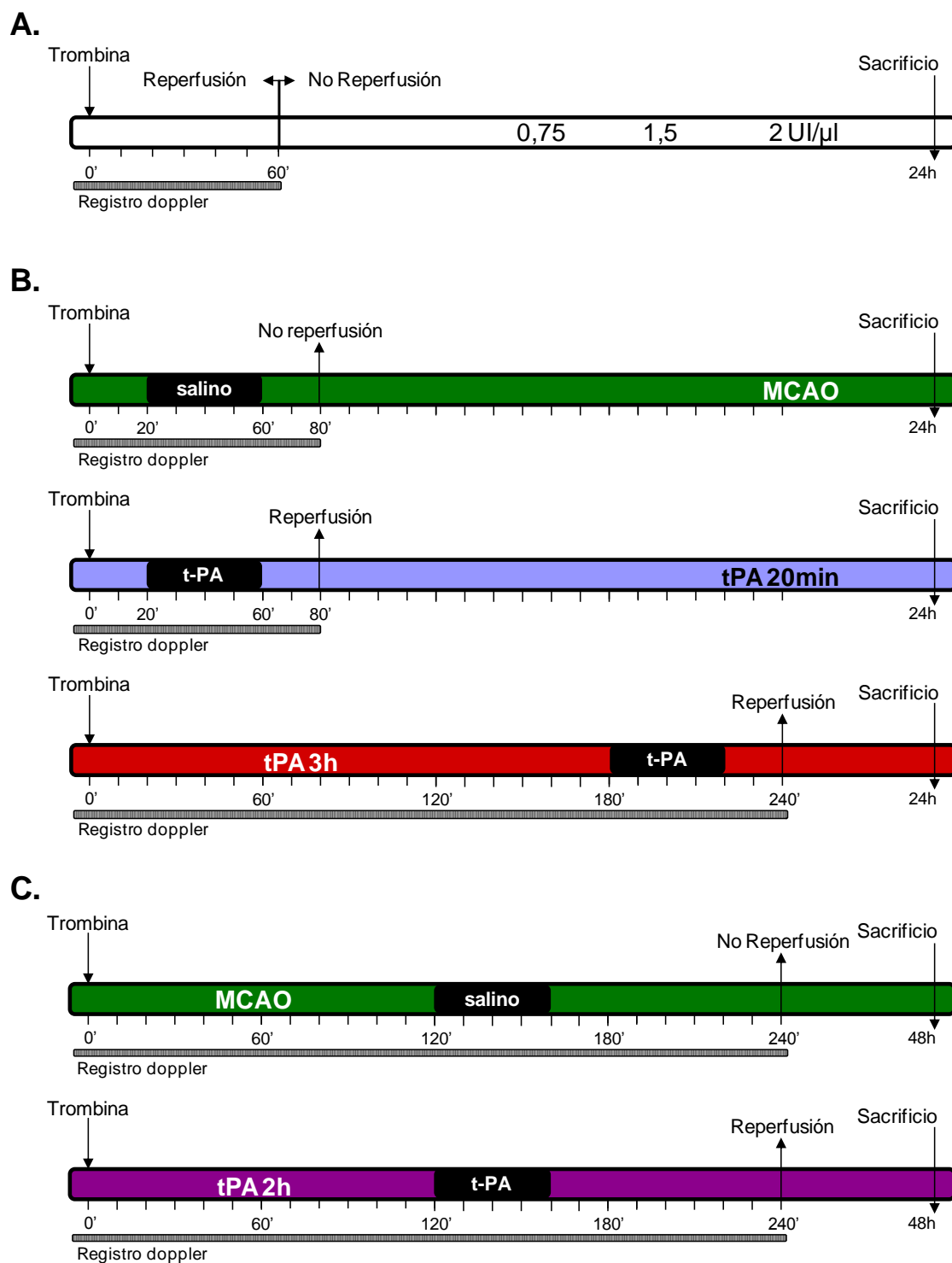


Figura 16. Protocolo experimental seguido durante el desarrollo del modelo de TH. **A.** Concentraciones de trombina probadas en el establecimiento del modelo (0,75, 1,5 y 2 UI/ μ l). **B.** Grupos experimentales durante la fase de recanalización con t-PA: **MCAO**, grupo control tratado con salino; **tPA 20min**, grupo de reperusión temprana; 3) **tPA 3h**, grupo de reperusión tardía. **C.** Grupos experimentales de la caracterización molecular: Grupo **MCAO**, tratado con salino y no reperfundido y 2) Grupo **tPA 2h**, tratado y reperfundido con t-PA a las 2h de isquemia.

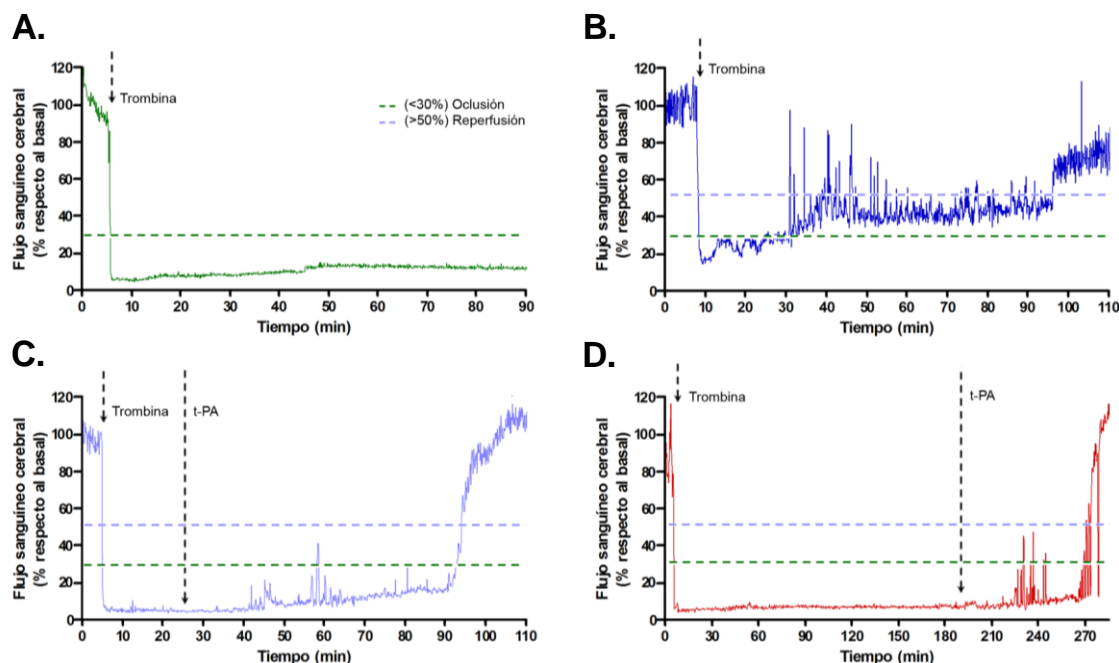


Figura 17. Registro Láser-Doppler representativo de cada grupo experimental. **A.** Isquemia permanente del grupo **MCAO**, con caída del registro por debajo del 30% del nivel basal. **B-D.** Isquemias transitorias de los grupos **Rep Esp**, **tPA 20min** y **tPA 3h**, con una recuperación del flujo superior al 50% respecto al basal.

Gracias a la experiencia previa adquirida durante la estandarización del modelo, se pudieron establecer los siguientes **criterios de exclusión**, casos que no fueron considerados para las determinaciones posteriores:

- Oclusión o reperusión parcial: Cuando no se producía, bien la isquemia, bien la recanalización de todas las ramas arteriales.
- Daño estriatal: Probablemente debido a que se ocluyó, no sólo el tronco común de la MCA, sino también las arterias lenticuloestriales (más basales).
- Hemorragia extraparenquimal: Probablemente debido a un daño vascular durante la inyección o a un daño quirúrgico y posterior tratamiento con t-PA.

En estos experimentos se determinó la reperusión durante la primera hora tras el tratamiento y, a las 24 h, se observó si la MCA seguía aún ocluida o, por el contrario, había reperfundido. Además, se estudiaron los déficits neurológicos (escala mNSS, n=6) y, tras el sacrificio a las 24 h, se midieron el volumen de infarto y el edema cerebral. También se clasificó la hemorragia, se midió su área (tinción con TTC, n indicada en la explicación de los grupos experimentales), así como el volumen de sangre extravasado (espectrofotometría de hemoglobina, n=6). Por último, y en experimentos

independientes de todas las demás determinaciones, se midieron los parámetros sanguíneos (n=4) y se realizó una observación histológica de la hemorragia (n=2).

1.1.3. Caracterización molecular de la TH

Tras la puesta a punto del modelo, se decidió evaluar el estado de algunas moléculas cruciales para la estructura y funcionamiento de la BHE y que, según la literatura previa (para revisión ver (Wang and Lo, 2003; Sandoval and Witt, 2008; Yang and Rosenberg, 2011), se alteran durante la TH del ictus isquémico. Para tal fin, 2 h después de la oclusión con trombina, se administró 10 mg/kg de t-PA (grupo **tPA 2h**, n=10) o un volumen equivalente de salino (grupo **MCAO**, n=8) por vía intravenosa (**Figura 16C**). En este caso, la monitorización del flujo sanguíneo cerebral con el láser-doppler se realizó hasta las 2 h después del tratamiento (4 h de isquemia). En estos animales se determinó su estado neurológico a las 24 y 48 h de isquemia (escala mNSS y *corner test*, n=6) y, tras su sacrificio a las 48 h, el volumen de infarto y el edema (tinción de Nissl). Además, se cuantificaron el área hemorrágica (tinción de las peroxidases endógenas, n=6), la actividad gelatinasa cerebral (zimografía *in situ* y densitometría, n=6) y las proteínas de BHE claudina-5 y colágeno IV (inmunohistoquímica y densitometría n=6).

1.2. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

El estudio del papel del hierro en la isquemia cerebral se abordó también en diferentes fases. En la primera, se pretendía evaluar rápidamente la cinética de la ferritina sérica, por lo cual se empleó el modelo de ligadura, más sencillo. En la segunda parte experimental, se evaluaron los posibles marcadores sanguíneos relacionados con la TH y la implicación del hierro, empleándose el modelo tromboembólico anteriormente desarrollado. Con las muestras de ambos experimentos se estudió el papel del hierro en la isquemia y en la TH.

1.2.1. Cinética de la ferritina sérica y papel del hierro en la isquemia cerebral

El objetivo de estos experimentos fue estudiar si la ferritina sérica seguía siendo, tras un ictus, un marcador fiable de los niveles de hierro o, por el contrario, su concentración cambiaba tras la isquemia cerebral. Para ello, animales con sobrecarga de hierro (alimentados con una dieta especial durante 9 semanas) o con niveles estándar de

hierro (controles) fueron asignados aleatoriamente a 5 grupos experimentales (total 10 grupos):

- **TIS MCAO:** (n=6-7) Grupos de isquemia permanente sometidos al modelo tromboembólico *in situ*.
- **Lig MCAO:** (n=6-7) Grupos de isquemia permanente mediante el modelo de ligadura distal de la MCA.
- **Lig 1h:** (n=11) Grupos de isquemia transitoria por el modelo de ligadura, con recanalización 1 h después de la isquemia.
- **Lig 3h:** (n=6-7) Grupos de isquemia transitoria por ligadura, con recanalización 3 h después de la isquemia.
- **Sham:** (n=6-7) Grupos control, operados pero no isquémicos.

A las 0, 3 y 24 h de isquemia se realizaron tomas de sangre de la cola del animal para medir la ferritina sérica (kit ELISA, n=4-7). Además, a las 24 h se determinaron los déficits neurológicos (escala mNSS) y, tras el sacrificio, se midieron el volumen de infarto, el edema cerebral y el área hemorrágica (tinción con TTC, n indicada en la descripción de los grupos). Por último, y en experimentos independientes de todas las demás determinaciones, se midieron los parámetros sanguíneos 0 y 15 min post-isquemia (n=4) para ver si existían diferencias entre los animales con sobrecarga de hierro y los controles.

1.2.2. Marcadores sanguíneos de la TH e implicación del hierro en el proceso

Por último, con el fin de estudiar el posible papel del hierro en la transformación hemorrágica del ictus isquémico, así como sus posibles marcadores séricos, se usó el modelo de TH previamente desarrollado. De nuevo, se emplearon animales con sobrecarga de hierro y animales controles que fueron aleatoriamente asignados a 6 grupos experimentales (n=8, total 10 grupos):

- **MCAO:** Grupos de isquemia permanente, tratados con salino a los 20 min.
- **tPA 20m:** Grupos reperfundidos con t-PA a los 20 min de isquemia.
- **tPA 1h:** Grupos reperfundidos por la administración de t-PA 1 h tras la isquemia.
- **tPA 3h:** Grupos recanalizados administrando t-PA a las 3 h de la oclusión.
- **Sham sal** y **Sham tPA:** Grupos en los que se expuso la arteria, pero no se ocluyó. Tratados con salino o t-PA respectivamente.

Tras la cirugía y el análisis del registro del láser doppler, se determinó el porcentaje de perfusión en cada grupo, así como el tiempo medio de recanalización.

Además, se tomaron muestras sanguíneas a las 0, 3, 6 y 24 h para el análisis de las concentraciones séricas de las proteínas MMP-2, MMP-9, fibronectina celular y del malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica (kits ELISA, n=4-8). En estas mismas muestras también se determinó la actividad MMP (zimografía, n=4). A las 24 h se determinaron el volumen de infarto y el edema (tinción de Nissl, n=8), se clasificó la hemorragia y se midió su área (tinción de las peroxidasas endógenas y estereología, n=8) y se realizaron inmunohistoquímicas de la IgG extravasada (para cuantificar el daño a BHE, n = 4), de NIMP-R14 (para cuantificar los neutrófilos infiltrados, n = 4) y de MMP-9 (molécula que media la disrupción de BHE, n = 4).

2. TÉCNICAS *IN VIVO*

2.1. Animales

Durante el DESARROLLO DEL MODELO DE TH se emplearon ratones macho ICR (Harlan, España) de entre 2-5 meses de edad y con un peso comprendido entre 25-35 g. Para los experimentos de la SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL se emplearon ratones macho ICR (Harlan, España), pero de un mes de edad, pesando unos 15 gr. Los animales fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos y alimentados con dietas diferentes durante 9 semanas:

- **Grupo Control**: recibió una dieta estándar para el mantenimiento de roedores (2014, Harlan, España), con un contenido en hierro de 50 mg/kg.
- **Grupo Sobrecarga de Hierro**: alimentado con una dieta enriquecida con 2.5% de carbonil iron (TD 08704, Harlan, España). De esta manera, los animales desarrollan unos niveles sistémicos altos de hierro, por lo que este tipo de alimentación ha sido empleada como modelo de hemocromatosis (Castellanos et al., 2002; Petrak et al., 2007), enfermedad que cursa con un acúmulo excesivo de hierro en el organismo.

Finalmente, tras 9 semanas de dieta, y con una edad de entre 3-5 meses y un peso de entre 35-45 g, los animales fueron sometidos al protocolo experimental anteriormente detallado. En cualquier caso, los animales tuvieron acceso a comida y bebida *ad libitum* durante todo el procedimiento y se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura, humedad y ventilación, siguiendo un ciclo invertido de luz/oscuridad.

Todos los protocolos de experimentación se realizaron según las indicaciones del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, que a su vez siguen las directrices de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE y el Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para algún experimento, los ratones ICR se obtuvieron de Charles River (Boston, MA, EE.UU.). En ese caso, además, los procedimientos fueron aprobados por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales del *Massachusetts General Hospital (Massachusetts General Hospital Animal Care and Use Committee)* conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del *National Institutes of Health (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)*.

2.2. Modelo tromboembólico *in situ*

El modelo TIS (Orset et al., 2007) consiste en inyectar trombina en la MCA para producir un trombo y así ocluir la arteria. La recanalización se produce administrando t-PA por vía intravenosa, que disuelve el coágulo.

A) ELABORACIÓN DE LAS MICROPIPETAS: La inyección de trombina se realizó con micropipetas, elaboradas con ayuda de un *puller* vertical (Pp-83 o PC-10, Narishige, Japón) a partir de capilares graduados (15 mm/ μ l) (Ref 555/5, Assistant Germany, Alemania). La punta se cortó a un tamaño aproximado de unos 50 μ m de diámetro, lo suficientemente pequeño para poder entrar en la arteria sin dañarla en exceso y lo suficientemente grande para evitar la coagulación de la punta durante la inyección.

Para cargar la trombina (α -trombina de ratón, Sigma-Aldrich, EE.UU., Gentaur, Bélgica o Molecular Innovations, EE.UU.) se colocó la micropipeta en un estereotáxico (Davis Kopfs Instruments, EE. UU.) y se acopló a un sistema neumático consistente en una jeringa conectada a un tubo de silicona. A continuación, se bajó la punta hasta la trombina y se ejerció presión negativa (succión) para cargarla, conservándose a -20°C hasta su uso.

B) PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: Para anestesiarse a los animales se empleó isofluorano (IsoVet, Piramal Healthcare, Reino Unido) al 3% en la inducción y 1-2% para el mantenimiento, en una atmósfera de N₂O/O₂ al 70%/30% respectivamente. Los animales se colocaron en un estereotáxico para impedir cualquier movimiento durante

la inyección, y se reguló su temperatura en torno a los 37°C con una manta térmica provista de una sonda rectal (HB 101/2, Harvard Apparatus, EE.UU.).

Para localizar la MCA se realizó una incisión en la piel entre la oreja y el oído derechos, desde la sutura sagital hasta el arco zigomático, quedando expuesto el músculo temporal. A continuación, se practicó una incisión longitudinal en la inserción de dicho músculo a lo largo de la sutura temporo-parietal y se retrajo el músculo para exponer el hueso temporal. Con ayuda de una lupa binocular (PZMIV, World Precision Instruments, EE. UU.) se observó la MCA por transparencia, se practicó un trépano (Harvard Apparatus, EE.UU.) de 2-3 mm de diámetro allí donde se visualizaba la bifurcación de las ramas rostral y caudal y, finalmente, se retiraron las meninges. El trépano se protegió con algodón húmedo hasta la inyección de la trombina.

Para comprobar y medir la oclusión y/o reperfusión arterial se colocó una sonda láser-doppler (418-1, Perimed AB, Suecia) en territorios más distales a los ocluidos. Para tal fin, se realizó un segundo trépano mucho más pequeño que el primero, esta vez en el hueso parietal y sobre la rama caudal de la MCA. El flujo medido previo a la oclusión fue considerado el 100% (PeriFlux System 5000, Perimed AB, Suecia).

Finalmente, se volvió a colocar la pipeta cargada en el estereotáxico. Bajando lentamente y de forma paralela al tronco común de la MCA, se introdujo su punta en el lumen del vaso (**Figura 18**) y, aplicando presión positiva en el sistema, se inyectó a contraflujo 1 μ l de trombina. Para permitir la estabilización del coágulo, la pipeta se retiró a los 10 min de la oclusión. Se consideró **oclusión estable** cuando se producía una caída brusca y mantenida del flujo sanguíneo cerebral medido en el registro del láser-doppler (<30%) acompañada de un cambio de color del vaso (**Figura 19A**). La recuperación total o parcial del flujo en cualquier rama de la arteria se consideró **reperfusión espontánea**.

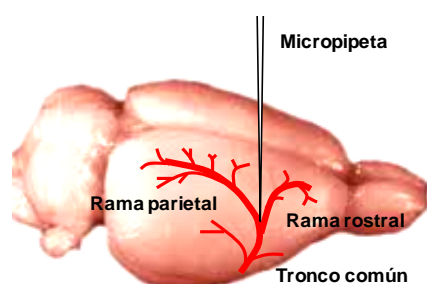
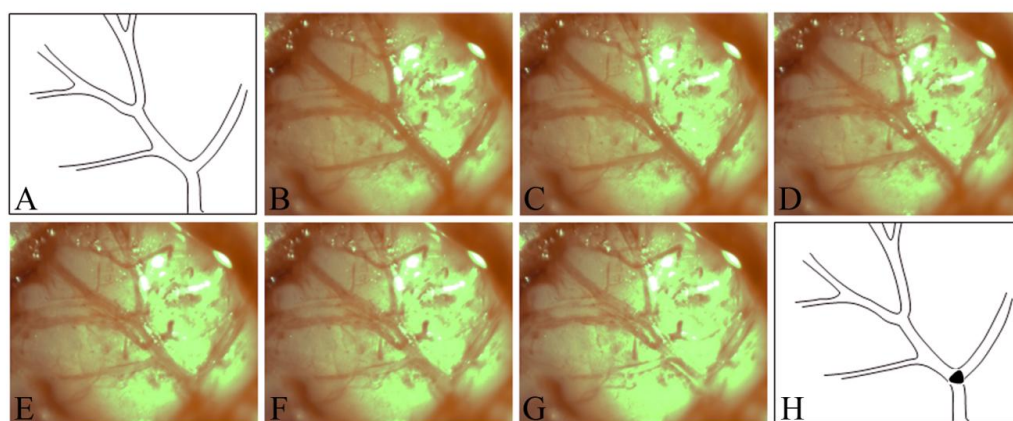


Figura 18. Esquema de la MCA. La micropipeta se introduce en la bifurcación de la arteria en sus ramas parietal y rostral, ocluyéndose el tronco común al inyectar trombina.

Con el fin de administrar t-PA (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Alemania) o salino, se disecó y canuló la vena caudal en la base de la cola. Con ayuda de una bomba (PhD 2000, Harvard Apparatus, EE.UU.) se administró el tratamiento (10% bolo, 90% infusión durante 40 min). Se definió **reperusión** efectiva del vaso cuando se producía una recuperación estable del flujo sanguíneo superior al 50% del flujo basal así como una recuperación del color en todas las ramas arteriales (**Figura 19B**).

A.



B.

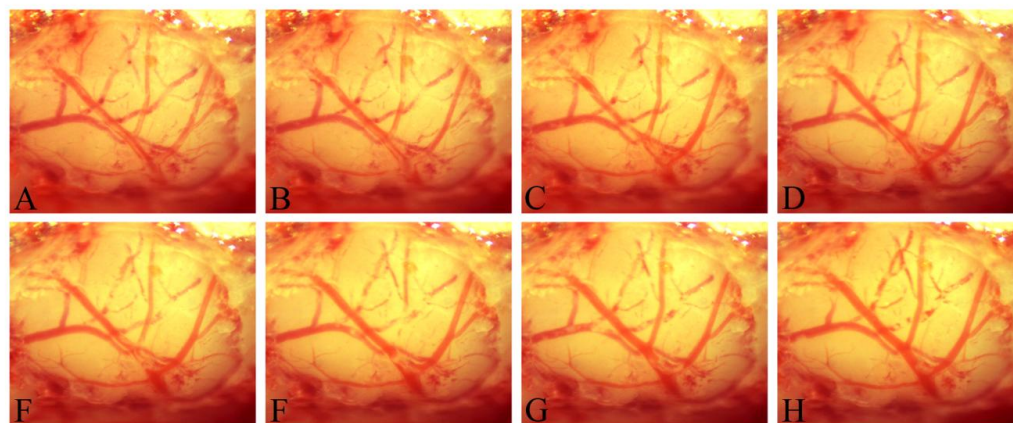


Figura 19. Oclusión y reperusión de la MCA. **A.** Oclusión de la ACM: La arteria se va poniendo progresivamente blanca al tiempo que se ocluye (**B-G**). **A** y **H** son esquemas representativos de la arteria antes y después de la oclusión. **B.** Reperusión de la MCA: Tras la oclusión, la arteria se ve de un rojo pálido (**A**). La infusión de t-PA abre progresivamente la arteria (**B-H**).

2.3. Modelo de la ligadura

El modelo empleado de ligadura distal de la MCA es una variante del descrito originalmente por Chen (Chen et al., 1986). Basicamente, consiste en ligar la MCA y la arteria carótida común (CCA) ipsilateral para interrumpir el flujo sanguíneo. La reperusión puede realizarse si se desatan las ligaduras practicadas.

Brevemente, los animales se durmieron con isoflurano al 3% (IsoVet, Piramal Healthcare, Reino Unido) en una atmósfera de N₂O/O₂ al 70%/30% respectivamente. Tras la inducción, la anestesia se mantuvo al 1-2% y se reguló la temperatura del animal en torno a los 37°C con ayuda de una manta térmica (HB 101/2, Harvard Apparatus, EE.UU.).

Seguidamente se practicó una incisión en la línea media del cuello, a la altura de la inserción del esternocleidomastoideo en la clavícula. Tras retraer dicho músculo y las salivales submaxilares, se procedió a aislar y ligar la CCA derecha del animal, empleando una seda 6/0. A continuación, se accedió a la MCA derecha de forma similar a lo descrito en el modelo TIS. Se practicó un segundo corte entre la oreja y el oído derechos, se retrajo el músculo temporal y se trepanó el hueso allí donde se observaba la arteria por transparencia. Tras retirar las meninges, se ligó la MCA con una seda 9/0.

La reperusión del vaso, en los grupos experimentales en los que procedía, se realizó retirando las ligaduras a los tiempos ya indicados (1 y 3 h) y confirmando la recanalización *de visu* con ayuda de una lupa binocular (WPI, EE. UU.). Los animales en los que se expusieron la CCA y la MCA pero no se ocluyeron, fueron el grupo Sham.

2.4. Extracciones sanguíneas

Con el fin de elaborar un perfil temporal de determinadas moléculas, se realizaron tomas sanguíneas a diferentes tiempos tras la isquemia para obtener suero. Durante el estudio de la CINÉTICA DE LA FERRITINA SÉRICA se extrajeron de la cola unos 100 µl de sangre a 0, 3 y 24 h post-isquemia. En el estudio de los MARCADORES SANGUÍNEOS DE LA TH se extrajo a 0, 3, 6 y 24 h la misma cantidad, pero de la vena femoral.

En cualquier caso, la sangre se dejó a temperatura ambiente durante una hora y *overnight* a 4°C para permitir la coagulación. Seguidamente, se centrifugó 10 min a 4°C y a 1.500 g para obtener el suero, que se conservó a -80°C hasta su uso.

2.5. Medida de los parámetros sanguíneos

Para asegurarse de que las diferencias halladas entre los distintos grupos experimentales se deben exclusivamente al tratamiento es necesario medir los parámetros sanguíneos y comprobar así que se encuentran dentro de los valores normales y que no difieren entre los distintos grupos. Para tal fin, se eligieron los siguientes parámetros arteriales: presión arterial media (MABP), pH, presión parcial de CO₂ y O₂ (pCO₂ y pO₂), hematocrito (Htc) y hemoglobina (Hb).

Para el DESARROLLO DEL MODELO DE TH, un conjunto de animales, independiente del resto de experimentos, fueron asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos de tratamiento (n=4): MCAO (salino), tPA 20min, y tPA 3h, y sometidos al protocolo quirúrgico del modelo TIS. Previamente a la oclusión de la MCA, se canuló la arteria femoral izquierda y se monitorizó la presión arterial antes de la isquemia durante al menos 2 min con el sistema Lab-Trax-4/24T (World Precision Instruments, EE.UU.). A continuación se extrajeron 100 µl de sangre de la misma arteria y se analizaron el resto de parámetros indicados con el sistema i-STAT y el cartucho CG8+ (Abbott, EE.UU.). El análisis de la MABP y del resto de parámetros sanguíneos se repitió a los 15, 80 y 240 min de la oclusión de la MCA. El volumen de sangre extraído se repuso con salino estéril después de cada toma. Finalmente, tras el último análisis a los 240 min, los animales fueron sacrificados extrayendo el máximo volumen de sangre posible por punción cardiaca en un 10% de citrato. Centrifugando 5 min a 1200 g y 4°C se extrajo el plasma, que se conservó a -80°C hasta el análisis de los parámetros de coagulación (tiempo parcial de tromboplastina activada (PTTa)).

Para el estudio de la SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL, otra serie de animales, independiente del resto de experimentos, fueron sometidos al modelo de ligadura de la MCA (n=4). De forma similar a lo anteriormente explicado, se estudiaron los parámetros basales y 15 min tras la ligadura, en los grupos control y de sobrecarga de hierro.

2.6. Evaluación de los déficits neurológicos

La isquemia cerebral produce unos signos neurológicos que varían según la zona infartada y, por lo tanto, cuanto mayor es el daño, mayores son los déficits. Con el fin de cuantificarlos, se empleó:

A) ESCALA MNSS: la escala mNSS (*modified neurological severity score*) evalúa el déficit sensorimotor, el equilibrio y los reflejos, otorgando 1 punto a la presencia del signo isquémico hasta un máximo de 14 (**Tabla 6**). Pese a estar sujeta a la subjetividad del evaluador, permite una evaluación rápida y es lo suficientemente sensible como para detectar los déficits desde 1 h hasta 30 días post-isquemia (Chen et al., 2001). La escala fue aplicada por un investigador experimentado en su uso y ciego al tratamiento.

Tabla 6. Escala mNSS (*modified neurological severity score*) aplicada en ratón.

| | Puntos |
|---|-------------|
| Motor | 0-6 |
| 1. Levantar al ratón por la cola durante 30 s | 0-3 |
| Flexión de la extremidad anterior | 1 |
| Flexión de la extremidad posterior | 1 |
| La cabeza se mueve más de 10° en el eje vertical | 1 |
| 2. Poner al ratón en el suelo | 0-3 |
| Incapacidad para marchar recto | 1 |
| Marcha en círculos hacia el lado parético | 1 |
| Se cae sobre el lado parético | 1 |
| Equilibrio (Beam Balance) | 0-6 |
| Agarra un lado de la barra | 1 |
| Abraza la barra y se suelta una extremidad | 2 |
| Abraza la barra y se sueltan dos extremidades o da una vuelta (>30 s) | 3 |
| Intenta balancearse pero cae (>20 s) | 4 |
| Intenta balancearse pero cae (>10 s) | 5 |
| Cae sin intentos de balanceo o agarre (<10 s) | 6 |
| Reflejos | 0-2 |
| Pinna (Sacude la cabeza al tocar el meato auditivo con un algodón) | 1 |
| Corneal (parpadea cuando la cornea es ligeramente tocada) | 1 |
| TOTAL | 0-14 |

Se otorga un punto por la incapacidad de realizar una de las tareas o por la ausencia de reflejo. 1-4 indica lesión leve; 5-9, lesión moderada; 10-14, lesión grave.

B) CORNER TEST: Consiste básicamente en dos tablas unidas formando un ángulo de unos 30°, con una pequeña abertura en la esquina que estimula al animal para que camine hacia ella. Los animales giran hacia la izquierda o hacia la derecha, realizándose un total de 10 repeticiones aunque, para que éstas sean válidas, el roedor tiene que levantarse siempre sobre sus patas traseras, calculándose el índice de lateralidad. El día previo a la cirugía, se tomaron unas medidas basales para normalizar los datos. Esta prueba evalúa deficiencias sensorimotoras incluso a largo plazo (Zhang et al., 2002b).

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES

3.1. Cálculo del volumen de infarto

A) TINCIÓN DE TTC: Para posibilitar la medición de la hemorragia se necesitaba lavar la sangre intravascular antes de realizar la tinción. Por ello, tras anestesiarse los animales con isoflurano, se abrió la caja torácica y se perfundió tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4 por el ventrículo izquierdo a un flujo de 5 ml/min durante 10 minutos, cortando la aurícula derecha para evitar la ruptura vascular por una presión excesiva.

Tras extraer el cerebro, se realizaron 8 cortes coronales de 1 mm de grosor con ayuda de una matriz (RBMS-200C, World Precision Instruments, EE.UU.). Dichos cortes fueron teñidos durante 5 min con TTC al 2-3% (Panreac, España) en PB 0,2M pH 7,4. El TTC es una sal que es reducida a formazán por la cadena respiratoria mitocondrial y precipita, dando una coloración rojiza donde haya viabilidad celular, y quedando la zona infartada de color blanco. Finalmente se colocaron las secciones teñidas sobre una plantilla milimetrada y se fotografiaron con una cámara digital (Coolpix 990, Nikon Corporation, Japón).

B) TINCIÓN DE NISSL: Para realizar esta técnica se necesita tanto lavar la sangre intravascular (posibilitando la tinción de peroxidasas endógenas), como fijar con PFA (salvo si se va a llevar a cabo la zimografía *in situ*). Por ello, se sacrificaron los animales y se les perfundió con PB 0,1 M pH 7,4 a un flujo de 5 ml/min durante 5 min. A continuación, se pasaron unos 80 ml de paraformaldehído (PFA) frío y al 4% en PB 0,1 M pH 7,4 al mismo flujo durante 20 min. Tras extraer el cerebro, éste se mantuvo *overnight* a 4°C en PFA, seguido de 2 días en sacarosa 30% en PB 0,1 M; por último, se congeló en isopentano y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Con ayuda de un criostato (JUNG CM1800, Leica, EE.UU.) se cortaron secciones de 15 μ m de grosor. Para la tinción de Nissl se emplearon un total de 21 cortes, separados uno de otro por 400 μ m y desde bregma 3,2 mm a bregma -4,8 mm. Esta técnica usa un colorante acidófilo, el violeta de cresilo, para teñir el núcleo, nucleolos y retículo endoplasmático rugoso de las células. Proporciona así una panorámica general de la distribución, tamaño y morfología de las neuronas en el sistema nervioso, lo que permite visualizar claramente el tejido infartado.

Para realizar esta tinción, las secciones fueron primero hidratadas en PB. Seguidamente, se incubaron 1-2 min en una solución de violeta de cresilo al 0,5%

(Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 1,5% de ácido acético. Posteriormente, se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente (70%, 95% y 100%, 30 s en cada uno) y, finalmente, se sumergieron en xileno durante 5 min. Tras cubrirlos, se colocaron sobre una plantilla milimetrada y se fotografiaron con una cámara digital.

C) CUANTIFICACIÓN DE LA ÁREAS: Una vez obtenidas las imágenes por cualquiera de los dos métodos explicados anteriormente (Nissl o TTC), se usó el *software* Image J, (Image J 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.) para, de forma ciega al tratamiento, medir las siguientes áreas de todos los cortes: Área del hemisferio ipsilateral (**Hipsi**), área del hemisferio contralateral (**Hcontra**) y área infartada (**Inf**). Esto permitió el cálculo del área infartada por dos métodos diferentes:

MÉTODO DIRECTO: Mide directamente el área infartada y se corrige por el índice de edema (**IE**).

$$\text{Área Infartada} = \text{Inf}/\text{IE} = \text{Inf}/(\text{Hipsi} / \text{Hcontra})$$

MÉTODO INDIRECTO: Resta el área sana del hemisferio ipsilateral (**Hipsi** – **Inf**) al hemisferio contralateral, anulando la sobreestimación del infarto por el edema.

$$\text{Área Infartada} = \text{Hcontra} - (\text{Hipsi} - \text{Inf})$$

El cálculo del **volumen total** de infarto se realizó como la suma de las proyecciones de estas áreas sobre la distancia de un corte al siguiente y se representó como porcentaje de hemisferio infartado respecto al hemisferio sano. Ambos métodos tienen sus ventajas e inconvenientes pero, aunque los datos no variaron significativamente usando uno u otro método, se eligió el método directo para representar en el apartado de resultados porque la varianza obtenida fue menor.

3.2. Cálculo del edema cerebral

Como medida del edema se empleó el porcentaje de aumento del volumen del hemisferio ipsilateral tras el daño (Maier et al., 1998). Para ello se utilizaron los mismos cortes teñidos con TTC o con la tinción de Nissl que se usaron para medir el volumen de infarto, según la siguiente fórmula:

$$\text{Edema (\% de hemisferio)} = (\text{Hipsi} - \text{Hcontra}) / \text{Hcontra} \times 100$$

3.3. Clasificación macroscópica de la hemorragia

Muchos estudios clínicos, y también alguno experimental, clasifican la hemorragia en diferentes clases según la magnitud y tipo de sangrado (del Zoppo et al., 1992; von Kummer and Hacke, 1992; Millan et al., 2007; Copin and Gasche, 2008):

- No hemorragia (NH): Cuando no hay hemorragia de ningún tipo.
- Infarto hemorrágico tipo 1 (HI-1): Cuando existen sangrados pequeños y aislados, llamados petequias, generalmente a lo largo del borde del infarto.
- Infarto hemorrágico tipo 2 (HI-2): Cuando las petequias convergen dentro del área infartada.
- Hemorragia parenquimal tipo 1 (PH-1): Caracterizado por la presencia de grandes acúmulos de sangre en menos del 30% del parénquima dañado.
- Hemorragia parenquimal tipo 2 (PH-2): Cuando las hemorragias ocupan más del 30% del tejido lesionado.
- Hemorragia remota (rPH): Cuando existe sangrado fuera del tejido isquémico.

Cada animal fue clasificado en uno de estos grupos por un investigador ciego al tratamiento, atendiendo al sangrado más extenso que presentaba en los 8 cortes histológicos. Finalmente, se calculó el porcentaje de cada uno de los tipos de sangrado en cada grupo de tratamiento. De esta sencilla manera se obtuvo la gravedad del sangrado en cada uno de los grupos de tratamiento.

3.4. Medida del área hemorrágica

A) HEMORRAGIAS VISIBLES: Consiste en cuantificar todos los sangrados detectables a simple vista, sin atender a su clasificación y sin tinción alguna. Para ello se utilizaron las imágenes de los cortes teñidos con TTC, trazándose el límite de cada sangrado individual con ayuda del *software* Image J (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.) según había sido descrito previamente (Zhang et al., 1999). El área hemorrágica se calculó como la suma del área de todas las hemorragias a lo largo de las 8 secciones.

B) TINCIÓN DE LAS PEROXIDASAS ENDÓGENAS: Se basa en teñir los glóbulos rojos para, a continuación, medir el área que ocupan los extravasados. Sin embargo, requiere eliminar los eritrocitos intravasculares, por lo que, durante el sacrificio, los animales se perfundieron con PB. Los glóbulos rojos tienen un alto contenido en peroxidasas, enzimas muy empleadas en técnicas de inmunohistoquímica asociadas a anticuerpos. Al oxidar un sustrato, la diaminobencidina (DAB), dan un color marrón allí donde estén, lo que permite detectar la proteína a la que se unió el anticuerpo. En este caso,

simplemente no se inhibieron las peróxidasas endógenas. La incubación directamente con DAB permite la detección de los eritrocitos y la visualización de la TH (Wakisaka et al., 2010).

Para realizar esta tinción se emplearon 21 secciones coronales de 30 μm de grosor, separadas cada una por 400 μm y desde bregma 3,2 mm a bregma -4,8 mm. Tras una hidratación rápida en PBS, se incubó con PFA 4% durante 20 min si durante el sacrificio no se había fijado para posibilitar la zimografía *in situ*. Posteriormente, se lavó con PBS y se incubó 20 min con una solución de DAB preparada según las instrucciones del kit (peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, EE.UU.). A continuación, se lavó de nuevo con PBS, se deshidrató en una batería de alcoholes de gradación creciente (70%, 95% y 100%, 30 s en cada uno) y finalmente, se sumergieron en xileno durante 5 min y se cubrieron.

Para la cuantificación, o bien se realizó una densitometría o bien un método estereológico:

- Densitometría: Con un microscopio óptico Eclipse 80i (Nikon Corporation, Japón) se obtuvieron fotografías de las secciones, las cuales se analizaron con el *software* ImageJ (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.). El tratamiento de la imagen consistió en convertirla a escala de grises y considerar como fondo inespecífico toda señal por debajo del umbral de 85 de intensidad. El programa midió automáticamente el **área** ocupada por la señal y la **integrated density**, producto de la multiplicación del área de la señal por la intensidad media, que mide la señal total.
- Estereología: La estimación estereológica del volumen ocupado por eritrocitos extravasados se realizó con un microscopio Olympus BX51 (Olympus, EE.UU.), objetivo de 10X y una videocámara DP-70 (Olympus, EE.UU), empleando el *software* Cast Grid (Visiopharm, Dinamarca). Tras la tinción, el número de secciones coronales empleadas en la cuantificación osciló entre 10-11 (una de cada 2, muestreadas sistemáticamente a intervalos de 800 μm). El volumen de hemorragia se estimó mediante el **principio de Cavalieri**, basado en el recuento de puntos asociados a un área que se localizan en la estructura a cuantificar, en este caso, las hemorragias. El volumen de sangrado se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen} = a(p) \cdot d \cdot \sum P$$

Siendo, $a(p)$ el área asociada al punto ($15845 \mu\text{m}^2$), d la distancia entre dos secciones consecutivas ($800 \mu\text{m}$) y $\sum P$ en sumatorio de puntos. La precisión de la estimación del volumen se evaluó por el **coeficiente de error (CE)**, el cual estuvo en torno al 30% en los grupos sin hemorragias (sham), entre el 5-10% en la mayoría y sobre el 2% en los grupos con mayor sangrado (tPA 3h).

3.5. Espectrofotometría de hemoglobina

Para cuantificar la cantidad de sangre extravasada se utilizó, aunque con algunas modificaciones, la técnica de la espectrofotometría de hemoglobina (Choudhri et al., 1997; Asahi et al., 2000). Ésta consiste en medir la cantidad de luz que absorbe un tipo de hemoglobina, la cianometahemoglobina, a una determinada longitud de onda. Como la absorbancia de una molécula es proporcional a su concentración, tras construir una recta patrón de absorbancia frente a concentraciones conocidas, se puede calcular la cantidad de hemoglobina de una muestra. Esta técnica se realizó tras la tinción con TTC porque, según había sido descrito previamente (Choudhri et al., 1997; Asahi et al., 2000), dicha tinción no afecta a la medida de hemoglobina.

La hemoglobina presenta diferentes estados de oxidación, cada uno de ellos caracterizado por un determinado perfil de absorbancia (**Figura 20**). El reactivo de Drabkin convierte todas las formas de hemoglobina a cianometahemoglobina, que se caracteriza por tener un pico de absorción a 540 nm. Si hubiera otras especies presentes no sería posible calcular una concentración midiendo la absorbancia en dicha longitud de onda puesto que todas absorben a 540 nm, aunque en proporciones diferentes.

La mayor parte de artículos que emplean esta técnica miden la absorbancia a 540 nm por ser el pico característico de la cianometahemoglobina, pero es un error, puesto que el pico máximo de esta forma se encuentra en torno a 420 nm. El análisis de esta longitud de onda es mucho más sensible, permitiendo detectar cantidades de hemoglobina mucho más pequeñas (Su et al., 2008).

Brevemente, tras la perfusión cardiaca para lavar la sangre intravascular y la obtención y tinción con TTC de las 8 secciones coronales, se recogió por separado todo el tejido de cada uno de los hemisferio ($n=6$). Ambos se procesaron de la misma manera, pero al contralateral se le añadieron cantidades conocidas de sangre para construir la recta patrón. A continuación, se homogeneizó 30 segundos en 250 μl de PB 0,1 M pH 7,4, se sonicó 1 min y se centrifugó a 30000 g y 4°C durante 30 min. 10 μl del sobrenadante se hicieron reaccionar con 20 μl del reactivo de Drabkin (Sigma-Aldrich,

EE.UU.) por duplicado durante 30 min y a temperatura ambiente y tras una nueva centrifugación a 16000 g y 4°C durante otros 30 min se obtuvo un último sobrenadante.

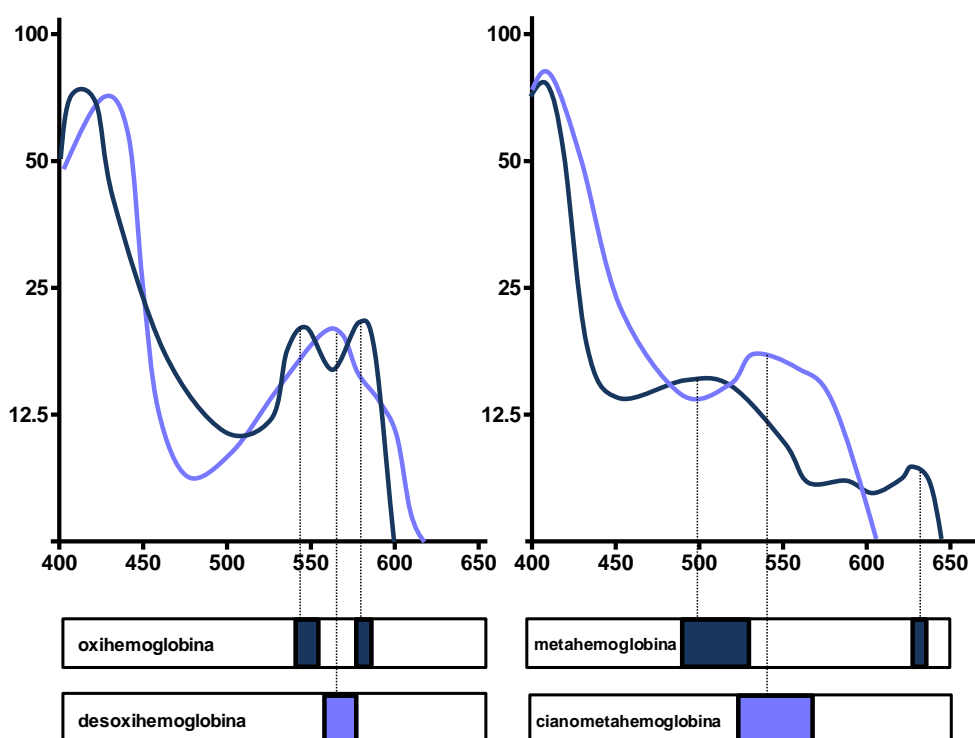


Figura 20. Espectro de absorción de las principales formas de hemoglobina. Cada una de ellas se caracteriza por un o unos picos de absorción diferentes. La cianometahemoglobina presenta su pico distintivo a 540 nm, pero su pico máximo es en torno a 420 nm.

La densidad óptica del último sobrenadante se analizó por duplicado tanto a 420 nm como a 540 nm mediante un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La relación entre absorbancia y cantidad de sangre se calculó mediante la recta patrón elaborada con los hemisferios contralaterales observándose, como se esperaba, que la recta construida a 420 nm presentaba un ajuste y sensibilidad mucho mayores que la de 540 nm.

3.6. Observación histológica de la hemorragia

Esta técnica se realizó en una serie de animales independiente del resto de experimentos, cuyo sacrificio se realizó lavando los eritrocitos intravasculares y fijando el tejido con PFA para posibilitar la tinción combinada de Nissl y peroxidasas endógenas.

Utilizando un microtomo (SM2000R, Leica Microsystems, EE.UU.) se obtuvieron 5 series de 50 μm de grosor de cada cerebro, quedando separados por 250 μm un corte del siguiente dentro de la misma serie. Tras montar una de ellas en un portaobjetos, se realizó la tinción de las peróxidasas endógenas seguida de la tinción de Nissl, ambas descritas anteriormente, pero con leves modificaciones. La combinación de estas técnicas permite observar la hemorragia presente en el tejido infartado (Garcia-Yebenes et al., 2011).

Tras una rápida hidratación en PB, los cortes se tiñeron 15 min con la solución de DAB (peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, EE.UU.). A continuación, se lavaron y se realizó la tinción de Nissl (0,5% de violeta de cresilo, Sigma-Aldrich, EE.UU. y 1,5% de acético durante 1-2 min). Seguidamente, se realizó una deshidratación rápida en alcoholes de 70%, 95% y 100% y, tras 5 min en HistoClear (Nationals Diagnostics, EE.UU.), se colocó el cubreobjetos con medio de montaje.

3.7. Zimografía *in situ*

Para conocer la implicación de las MMPs en el daño a la BHE y la subsiguiente TH, se decidió estudiar no su expresión, sino su actividad. Para ello se realizó la zimografía *in situ*, técnica que permite detectar y localizar la actividad gelatinasa en el tejido.

Para esta técnica se necesita que el tejido no esté fijado, para que las MMPs mantengan su actividad gelatinasa. Por ello, no se empleó PFA durante el sacrificio, lavándose simplemente la sangre intravascular con PBS, como se ha descrito previamente. De cada cerebro se tomaron 9 secciones coronales de 15 μm de grosor, una cada 400 μm , comprendiendo la región central del infarto (desde bregma 0,8 mm a bregma -2,4 mm). Estos cortes fueron incubados en una solución de gelatina de piel de cerdo conjugada con fluoresceína a la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, durante 17 h, a 4°C y en cámara húmeda (EnzCheck® gelatinase/collagenase assay kit, Invitrogen, EE.UU.). Tras lavarse varias veces con PBS, se cubrió con un medio con DAPI para marcar los núcleos celulares (ProLong®, Invitrogen, EE.UU.).

De cada una de las secciones, con ayuda de un microscopio de fluorescencia, Eclipse 80i (Nikon Corporation, Japón), y trabajando siempre con las mismas condiciones lumínicas, se tomaron fotos de diferentes regiones para su posterior cuantificación:

- Core: Se tomó una foto de esta área, localizada en el centro físico del infarto, entre las capas V-VI de la corteza.
- Periinfarto: Se tomó una foto del periinfarto más medial y otra del más lateral, ambas exclusivamente corticales.
- Contralateral: Se tomó una foto de la misma área fotografiada en el core, pero del hemisferio contralesional.

Las imágenes fueron densitometradas con el *software* ImageJ (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.), transformándolas previamente a escala de grises y restando toda señal por debajo de 30 de intensidad y toda partícula por debajo de 100 píxeles de tamaño. Ambos criterios se emplearon para minimizar el fondo. Finalmente, se tomaron las medidas tanto de intensidad del marcaje como el área.

3.8. ELISAs

Para la determinación de las concentraciones sanguíneas de la mayoría de las proteínas, se desarrollaron ensayos tipo ELISA u otros métodos colorimétricos. Todos ellos se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial, con una recta patrón con una R^2 superior a 0.95 y siempre analizando las muestras por duplicado.

- Ferritina sérica: El kit comercial usado fue E-90F (Immunology Consultants Laboratory Inc., EE. UU.).
- MMP-9: Se analizó la MMP-9 total con un kit comercial (EK0466, Boster Immunoleader, Boster Biological Technology Co. Ltd, EE. UU.), sin discernir entre la forma activa y la proforma.
- MMP-2: También se analizó la concentración total de esta proteína (ELM-MMP2-001, RayBiotech Inc., EE. UU.).
- cFN: En este caso, el ELISA fue específico de la forma celular de la fibronectina (E03C0734, Shanghai Bluegene Biotech Co. Ltd, China).
- MDA: La presencia de este compuesto se midió con una colorimetría, el método TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico). Éste consiste en hacer reaccionar el MDA con el ácido tiobarbitúrico, formando un aducto que se puede medir colorimétricamente. El kit comercial usado fue 10009055 (Cayman Chemical Company, EE. UU.).

3.9. Zimografía

Esta técnica se empleó para separar la forma activa de la pro-forma de la MMP-9 y medir la actividad gelatinasa en muestras sanguíneas. Primero, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (con dodecil-sulfato-sódico, (SDS)) y no reductoras, por ser un ensayo de actividad. La fase separadora del gel se hizo al 9% de acrilamida y 0,1% de gelatina a 20 mg/ml. Las muestras de suero se diluyeron 1:10 en tampón de carga (Laemmli, Bio-Rad Laboratories, EE. UU.) y se incubaron 10 min a 37°C. Tras cargarlas en el gel, se desarrolló la electroforesis a 120 V durante 3 h y a temperatura ambiente (sistema de Bio-Rad Laboratories, EE. UU.).

Seguidamente, se incubó el gel durante 1 h en agitación con un tampón de renaturalización (Tris-HCl 50 mM con 6 mM de CaCl_2 , 1,5 μM de ZnCl_2 y 2,5% de Triton X-100) y después en el tampón de desarrollo 16 h y a 37°C (el mismo, pero sin tritón). Finalmente, se tiñó 10 min con Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250, Bio-Rad Laboratories, EE. UU.) y se decoloró 3 min en una solución de metanol, ácido acético y agua a 4:1:5 respectivamente.

Tras el escaneo del gel, las imágenes se trataron con el programa ImageJ (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.), invirtiéndose primero y transformándolas a escala de grises después. Cada banda fue densitometrada para conocer su intensidad de señal y comparada con el fondo del gel. Todos los valores se calcularon en porcentaje respecto a las basales.

4.10. Inmunohistoquímica

A) SELECCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO: Determinadas proteínas fueron analizadas por inmunohistoquímica para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de TH. Para el DESARROLLO DEL MODELO DE TH se tomaron 9 secciones coronales de 15 μm de grosor de la región central del infarto separadas entre sí por 400 μm (desde bregma 0,8 mm a bregma -2,4 mm) y se analizaron las proteínas colágeno IV y claudina-5 por inmunofluorescencia. Para el estudio de la SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL se emplearon 21 secciones de 30 μm de grosor separadas una de otra por 400 μm (bregma 3,2 mm a bregma -4,8 mm) en el caso de la inmunohistoquímica de NIMP-R14 o bien un total de 9 secciones de 15 μm de tres regiones diferentes del infarto (zona rostral de bregma 1,6 a 0,8 mm; zona media de bregma 0 a -0,8, y zona caudal de bregma -1,6 a -2,4) para la inmunofluorescencia de Ig G y MMP-9.

B) INMUNOHISTOQUÍMICA: El conjunto de las inmunohistoquímicas realizadas se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Anticuerpos empleados para la detección molecular mediante inmunohistoquímica.

| Epitopo | Anticuerpo Primario | Anticuerpo Secundario | Amplificación | Suero de Bloqueo |
|--------------------|---|--|--|----------------------------|
| Claudina-5 | Anti Claudina-5 (ratón) (35-500, Invitrogen) 1:200 | Anti ratón-IgG Alexa 488 (cabra) (A11029, Invitrogen) 1:100 | --- | Suero de cabra (Jackson) |
| Colágeno IV | Anti Colágeno IV (conejo) (ab6586, Abcam) 1:200 | Anti conejo-IgG Alexa 647 (cabra) (A21245, Invitrogen) 1:200 | --- | Suero de cabra (Jackson) |
| IgG | Anti ratón-IgG Alexa 488 (cabra) (A11029, Invitrogen) 1:500 | --- | --- | Suero de cabra (Jackson) |
| NIMP-R14 | Anti NIMP-R14 (rata) (ab2557, Abcam) 1:500 | Anti rata-IgG biotinilado (conejo) (BA-4000, Vector) 1:500 | Avidina-biotina (PK-6100, Vector) 1:200 | Suero de conejo (Jackson) |
| MMP-9 | Anti MMP-9 (cabra) (AF909, R&D Systems) 1:200 | Anti cabra-IgG biotinilado (caballo) (BA-9500, Vector) 1:200 | Estreptavidina-Alexa 488 (S-11223, Invitrogen) 1:200 | Suero de caballo (Jackson) |

En el caso de la tinción de NIMP-R14, primeramente se realizó la inhibición de las peroxidasas endógenas con H_2O_2 al 1% en PB 0,1 M durante 10 min. El resto de inmunotinciones carecieron de este paso al tratarse de fluorescencia y no emplear peroxidasas para la localización de la proteína en cuestión. Tras varios lavados en PBS 0,1 M, se procedió a la permeabilización del tejido y al bloqueo de las uniones inespecíficas. Para ello se incubaron las secciones en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino (BSA) 0,5%, suero de la especie en la que se hizo el secundario al 10% y Triton X-100 al 0,25% en PB 0,1 M) durante al menos 2 h.

Seguidamente, se procedió a la incubación del anticuerpo primario, diluido en la misma solución de bloqueo, *overnight* y a 4°C. Tras varios lavados en PBS 0,1M con Triton al 0,25%, salvo en el caso de la inmunofluorescencia de Ig G, se continuó con la incubación del secundario durante 2 h en una solución de PBS 0,1 M, Triton X-100 al 0,25%, el suero correspondiente al 5% y BSA al 0,25%.

A continuación, en el caso de las tinciones de NIMP-R14 y MMP-9, tras varios lavados con PBS 0,1 M, se amplificó la señal. Para NIMP-R14 se empleó el complejo avidina-biotina (ABC-Elite, PK-6100, Vector Laboratories, EE.UU.) durante 2 h a

temperatura ambiente y, tras incubar con DAB 0,05% unos 5 min, se procedió al revelado con H_2O_2 al 0,005% durante 2 min. En el caso de MMP-9, la amplificación se realizó con el sistema avidina-estreptavidina, incubando con estreptavidina-A488 (Invitrogen, EE.UU.) durante 90 min. Finalmente, tras varios lavados se procedió a cubrir los portas con DePeX. En algunos casos, previamente se emplearon los marcadores nucleares TOPRO (Invitrogen, EE.UU.) o DAPI (Sigma, EE.UU.).

Las cuantificaciones se realizaron siempre tras la realización de un control negativo que se realizó de forma simultánea al resto del protocolo pero sin la incubación del anticuerpo primario.

C) CONTAJE DE NEUTRÓFILOS: Para la cuantificación de la tinción de NIMP-R14 se empleó un microscopio Olympus BX51 (Olympus, EE.UU.), un objetivo de 100X, una videocámara DP-70 (Olympus, EE.UU) junto con el *software* Cast Grid (Visiopharm, Dinamarca). La cuantificación consistió en una estimación del número de células positivas para dicho marcador en la totalidad de la corteza ipsilateral. Para ello se empleó un fraccionador óptico en diferentes etapas, que sirvieron para calcular la fracción total del tejido utilizado para la cuantificación: $f_T = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3$, donde:

- f_1 (1/26,7) representa la fracción del volumen de las secciones evaluadas: 30 μm de grosor de sección cada 400 μm de una sección a otra, evaluándose una de cada dos (30/800).
- f_2 (1/50) es la fracción del área evaluada por el disector (1711 μm^2) en el área total (85556,25 μm^2).
- f_3 (1/1,37-1/1,5) representa la fracción de la altura evaluada (8 μm) respecto a la altura del corte (11-12 μm).

Así, la fracción total evaluada osciló entre 1/2000 y 1/1800 del total. Además, la precisión de la estimación se evaluó por el **coeficiente de error (CE)**, el cual fue de un 5-10% en la mayoría de los grupos, salvo en los Sham.

D) CUANTIFICACIÓN DE LA EXTRAVASACIÓN DE Ig G: Esta técnica permite evaluar de forma rápida el estado funcional de la BHE, extravasándose mayor cantidad de IgG plasmática cuanto mayor es su apertura. Para la cuantificación se empleó un microscopio Eclipse E600 (Nikon Corporation, Japón), un objetivo de 2X y el software NIS-Elements BR (Nikon Corporation, Japón), que construyó una imagen única a partir de 4 adyacentes. Esta imagen fue densitometrada con el *software* ImageJ (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.), transformándolas previamente a escala de grises. Finalmente, se tomaron las medidas tanto de la intensidad como del área positiva para

el marcaje. La intensidad expresada fue la de la sección media de la zona de estudio, mientras que el área se expresó como el sumatorio del área positiva de las tres secciones estudiadas.

E) CUANTIFICACIÓN DE LA TINCIÓN DE MMP-9: Para esta cuantificación se empleó un microscopio Eclipse 80i (Nikon Corporation, Japón) y un objetivo de 20X. Siempre con las mismas condiciones lumínicas, se tomaron micrografías del core, en el centro físico del infarto, entre las capas V-III, las cuales fueron posteriormente densitometradas con el *software* ImageJ (ImageJ 1.44k, National Institutes of Health, EE.UU.). El procesamiento consistió de nuevo en la transformación a escala de grises y la sustracción de toda señal por debajo de 50 de intensidad para minimizar el fondo. Finalmente, se tomaron las medidas tanto de la intensidad como del área de marcaje, expresándose el área como el sumatorio y la intensidad como la media de las 9 secciones estudiadas.

4.11. Estadística

Todos los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para simplificar el análisis, se excluyeron los datos que quedaban fuera de la media $\pm 2 \times$ SEM. $P < 0,05$ fue considerado significativo. Para el análisis estadístico se emplearon tanto test no paramétricos como paramétricos dependiendo de si la muestra se ajustaba o no a una distribución normal (comprobado mediante el test de Kolmogorov-Smirnov). El estadístico no paramétrico realizado fue Kruskal-Wallis con el test de Dunns como *posthoc*, mientras que el paramétrico fue ANOVA seguido de Newman-Keuls. En el caso de comparar sólo entre dos grupos, el estadístico no paramétrico empleado fue el Mann-Whitney (aplicando la corrección de Welch si las varianzas no eran homogéneas), mientras que el paramétrico fue la t-Student. Para la tabla de contingencia se empleó el exacto de Fisher, separando los tipos de sangrado en ligero (no hemorragia y HI-1) y moderado (HI-2 y PH-1). Por último, para el análisis de muestras repetidas y de dos factores se utilizó ANOVA de dos vías.

An aerial photograph of a dry, hilly landscape. The terrain is covered with sparse, low-lying vegetation and numerous small, dark spots that could be rocks or patches of bare soil. Several light-colored, winding paths or roads are visible, curving through the hills. The overall tone is sepia or light brown, suggesting an older photograph or a specific color grade.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH

1.1. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO

1.1.1. Porcentaje de reperusión y volumen de infarto tras la inyección de trombina

El primer paso para conseguir un modelo de TH era obtener una oclusión estable tras la inyección de trombina, para lo cual se trabajó con diferentes concentraciones de trombina. La primera concentración que se probó fue 0,75 UI/ μ l, la descrita en el artículo original (Orset et al., 2007). Trabajando con esta dosis, n=6, se obtuvo una oclusión estable de la arteria (MCAO) sólo en un 17% de los casos. En el 83% restante, la arteria reperfundió espontáneamente en la primera hora tras la inyección de trombina (Figura 21B, Tabla 8). El volumen de infarto fue de $13,6 \pm 0,0\%$ de hemisferio para la MCAO y de $1,9 \pm 1,1\%$ de hemisferio en el grupo con reperusión espontánea (Figura 21, Tabla 8).

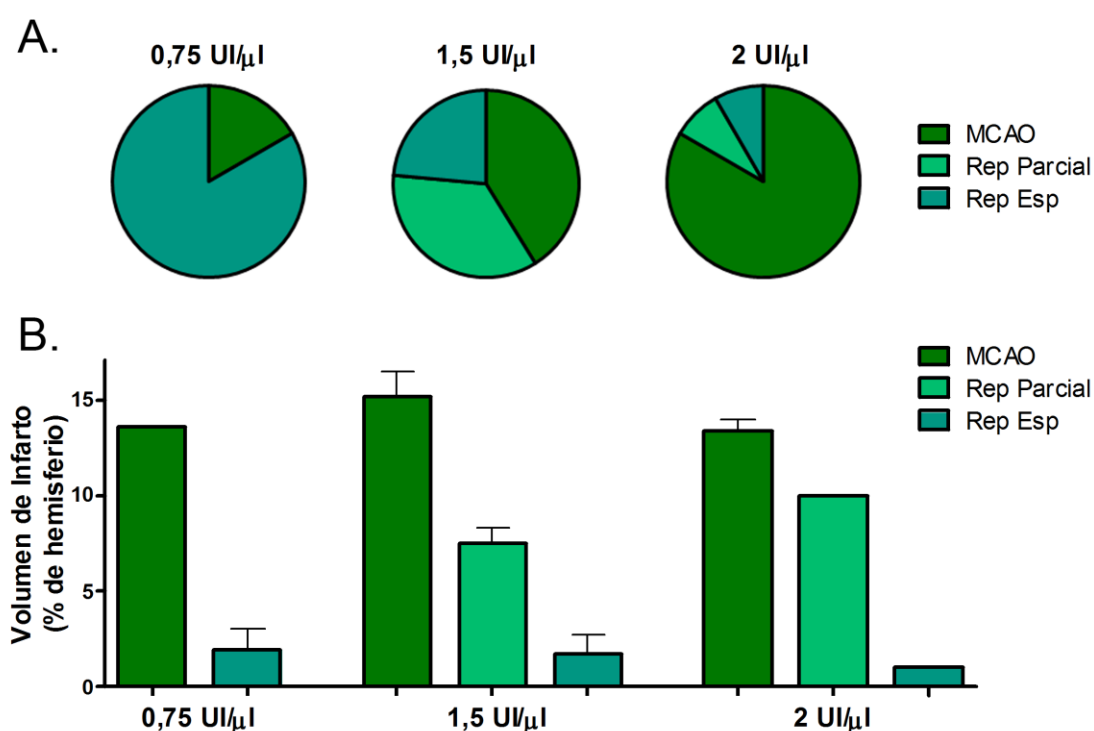


Figura 21. Comportamiento de las diferentes concentraciones de trombina probadas para producir una isquemia cerebral. Datos representados como media \pm SEM, n=6-17. **A.** Porcentaje de oclusión adecuada (MCAO) y de reperusión espontánea parcial (Rep Parcial) y total (Rep Esp) obtenido con cada una de las concentraciones de trombina probadas. **B.** Volumen de infarto agrupado según la estabilidad del coágulo de cada una de las concentraciones probadas.

La siguiente concentración probada fue la de 1,5 UI/ μ l (n=17). En este caso el 41% de los animales sufrieron una MCAO, pero el resto reperfundió durante la primera hora, un 35% de forma parcial y un 24% de forma completa (**Figura 21B, Tabla 8**). El volumen de infarto fue de $15,1 \pm 1,4\%$ en el grupo MCAO, de $7,5 \pm 0,8\%$ en el caso de perfusión parcial y de $1,7 \pm 1,0\%$ en el grupo con perfusión espontánea completa (**Figura 21A, Tabla 8**).

La última concentración de trombina inyectada fue de 2 UI/ μ l (n=12). Con esta concentración, el 84% de los animales tuvieron una oclusión adecuada de la MCA, un 8% una perfusión espontánea parcial y otro 8% una perfusión espontánea completa (**Figura 21B, Tabla 8**). El volumen de infarto fue de $13,4 \pm 0,6\%$ en el grupo MCAO, $9,9 \pm 0,0\%$ para la perfusión espontánea parcial y $1,0 \pm 0,0\%$ en el caso de la perfusión espontánea completa (**Figura 21A, Tabla 8**).

Tabla 8. Recopilación de Resultados del Establecimiento del Modelo.

| | 0,75 UI/ μ l | 1,5 UI/ μ l | 2 UI/ μ l |
|--|------------------|------------------|------------------|
| % Coágulo Estable | 16,7% | 41,2% | 83,3% |
| Vol Infarto MCAO | $13,6 \pm 0,0\%$ | $15,1 \pm 1,4\%$ | $13,4 \pm 0,6\%$ |
| % Perfusión Espontánea Parcial | --- | 35,3% | 8,3% |
| Vol Infarto Rep Parcial | --- | $7,5 \pm 0,8\%$ | $9,9 \pm 0,0\%$ |
| % Perfusión Espontánea Completa | 83,3% | 23,5% | 8,3% |
| Vol Infarto Rep Completa | $1,9 \pm 1,1\%$ | $1,7 \pm 1,0\%$ | $1,0 \pm 0,0\%$ |

Valores expresados como media \pm SEM.

1.2. RECANALIZACIÓN CON T-PA

1.2.1. Consideraciones generales: porcentajes de supervivencia y éxito

Tras determinar la concentración de trombina que producía una oclusión estable había que conseguir la recanalización arterial, disolviendo el coágulo previamente formado mediante la administración de t-PA. Como se ha descrito anteriormente, se decidió trabajar con un protocolo de administración temprana (a los 20 minutos) y otro de administración tardía (a las 3 horas), comparando ambos tratamientos siempre con el grupo control tratado con vehículo (isquemia permanente).

La concentración de trombina anteriormente elegida (2 UI/ μ l) produjo una oclusión estable en el 83,1% de los casos (**Figura 22**), caracterizada según los criterios

visuales y de láser-doppler ya descritos con anterioridad. El 16,9% restante reperfundió de manera espontánea durante la primera hora de isquemia, de los cuales un 45,5% lo hizo de manera parcial y un 54,5% de manera completa. Este último grupo fue analizado como un grupo **Reperusión Espontánea**, descrito anteriormente en el apartado “1.1.2. Recanalización con t-PA” de Materiales y Métodos.

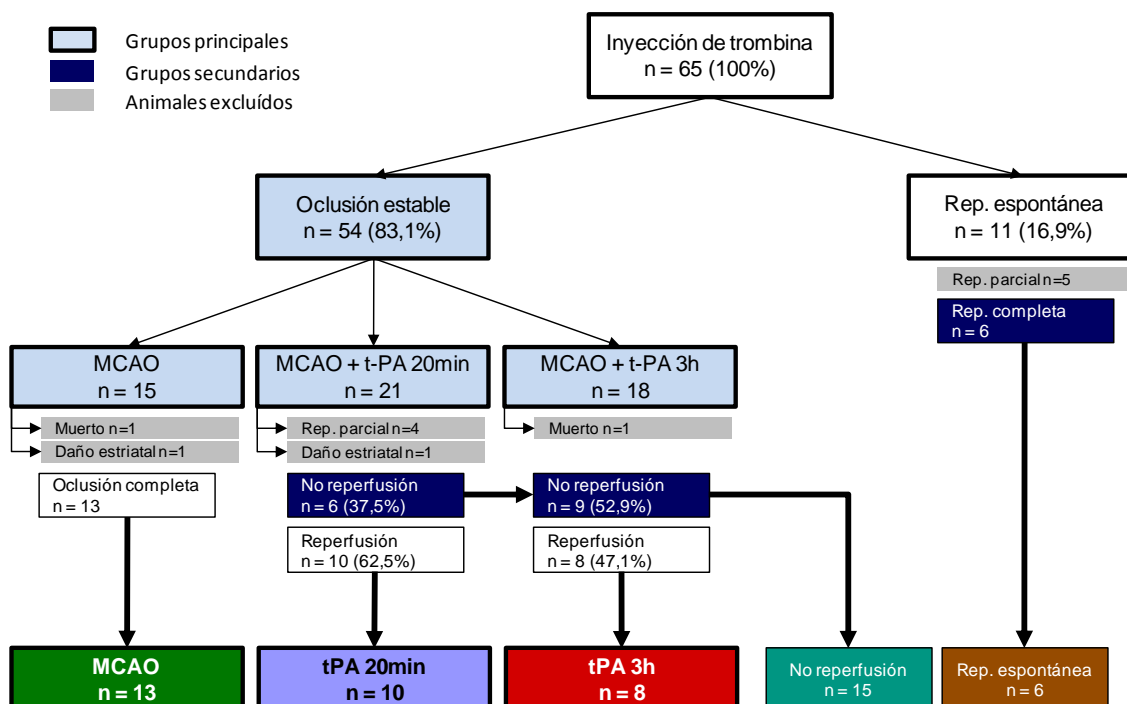


Figura 22. Cuadro explicativo de los grupos de análisis en el que se aprecian los porcentajes de oclusión, reperusión, supervivencia y éxito del modelo.

Por otro lado, tras el tratamiento con t-PA a los 20 minutos de la oclusión, un 62,5% de los animales respondieron favorablemente reperfundiendo en la primera hora (según los criterios de doppler ya descritos). En el caso de la administración de t-PA a las 3 horas de isquemia, el porcentaje de reperusión fue del 47,1% (**Figura 22**). Los restantes 37,5% y 52,9% respectivamente fueron casos que no reperfundieron durante la primera hora de tratamiento y fueron analizados conjuntamente en un último grupo, **No Reperusión**, también descrito con anterioridad.

Pese a que el porcentaje de supervivencia fue superior al 97%, la amplia variedad de respuestas al tratamiento con t-PA hizo que el porcentaje de éxito global del modelo fuera menor al 50%.

A las 24 h de la isquemia y previo al sacrificio, se observó si la arteria había recanalizado en el punto donde se había inyectado la trombina. Se concluyó que la totalidad de animales tratados con t-PA y que no habían reperfundido en la primera hora tras el tratamiento con t-PA (grupo no reperusión) estaban recanalizados a las 24 h, por lo que en algún punto intermedio el coágulo había sido disuelto. Del mismo modo, en el grupo MCAO se observó que sólo un 15% de los animales seguía ocluido a las 24 h de isquemia, habiendo sufrido autólisis del trombo el 85% restante.

1.2.2. Parámetros sanguíneos

Comparando con los niveles basales medidos, los parámetros sanguíneos (pH, $p\text{CO}_2$ y $p\text{O}_2$, Htc, Hb y MABP) no variaron significativamente durante los diferentes tiempos post-isquemia estudiados (15, 80 y 240 min). El tratamiento con t-PA a los 20 minutos o a las 3 horas tampoco alteró los parámetros respecto al mismo tiempo de isquemia del grupo tratado con vehículo (**Tabla 9**). Cabe destacar que se observó cierto grado de hipotensión y un pH ligeramente ácido a tiempos de isquemia prolongados (240 minutos), tanto en animales tratados con t-PA como en sus controles.

En cuanto al PTT(a) estudiado antes y después de la administración de t-PA tampoco se alteró de forma significativa (ratio $0,93 \pm 0,08$ vs $2,18 \pm 0,75$).

Tabla 9. Parámetros sanguíneos tras la isquemia en los diferentes grupos de tratamiento.

| | BASAL | PERÍODO ISQUÉMICO | | | PERÍODO DE REPERFUSIÓN | |
|----------------|----------------|-------------------|----------------|-----------------|-------------------------|----------------------|
| | 0 min MCAO | 15 min MCAO | 80 min MCAO | 240min MCAO | 80 min MCAO (tPA 20min) | 240min MCAO (tPA 3h) |
| pH | 7,3 \pm 0,0 | 7,3 \pm 0,0 | 7,3 \pm 0,0 | 7,1 \pm 0,1 | 7,3 \pm 0,1 | 7,1 \pm 0,1 |
| $p\text{CO}_2$ | 32,2 \pm 4,4 | 37,7 \pm 9,5 | 32,0 \pm 4,5 | 49,0 \pm 10,2 | 30,1 \pm 8,7 | 32,6 \pm 3,0 |
| $p\text{O}_2$ | 186 \pm 8 | 168 \pm 21 | 196 \pm 19 | 185 \pm 0 | 193 \pm 16 | 198 \pm 5 |
| Htc | 37,8 \pm 0,9 | 36,7 \pm 1,2 | 35,3 \pm 0,3 | 37,3 \pm 2,7 | 34,3 \pm 1,9 | 36,7 \pm 4,5 |
| Hb | 12,8 \pm 0,3 | 12,4 \pm 0,5 | 12,0 \pm 0,1 | 12,7 \pm 0,9 | 11,7 \pm 0,6 | 12,5 \pm 1,5 |
| MABP | 73,6 \pm 1,7 | 68,2 \pm 3,0 | 67,4 \pm 4,4 | 43,4 \pm 2,5 | 53,2 \pm 2,7 | 42,3 \pm 1,5 |

Valores expresados como media \pm SEM.

MABP indica presión arterial media (mm de Hg); $p\text{CO}_2$ y $p\text{O}_2$ son presiones parciales de dichos gases (mm de Hg); Htc, hematocrito (%); Hb, hemoglobina (mg/dl).

1.2.3. Efecto de la reperusión con t-PA sobre el daño neuronal

A las 24 h de isquemia se determinó la gravedad de la lesión midiendo el volumen de infarto mediante la tinción con TTC y los déficits neurológicos mediante la escala mNSS, ambos con el fin de conocer la gravedad de la lesión. En los animales isquémicos tratados con salino (grupo MCAO) el volumen de infarto fue de $11,7 \pm 0,6\%$ de hemisferio. La reperusión temprana con t-PA produjo una reducción significativa del volumen de infarto ($7,8 \pm 0,4\%$ de hemisferio, grupo tPA 20min) y de los síntomas neurológicos observados (**Figura 23, Tabla 10**). Esta reducción del volumen de infarto y la mejora del estado neurológico se observó también en el grupo Reperusión Espontánea ($6,6 \pm 1,5\%$ de hemisferio).

Sin embargo, la reperusión tardía con t-PA no alteró significativamente el tamaño de la lesión ($13,2 \pm 0,8\%$ de hemisferio, grupo tPA 3h) ni los síntomas observados. Del mismo modo, el tratamiento no efectivo con t-PA (grupo no reperusión) tampoco varió ni el tamaño de la lesión ni las manifestaciones clínicas observadas ($11,6 \pm 0,8\%$ de hemisferio, grupo No Reperusión, **Figura 23, Tabla 10**).

Tabla 10. Recopilación de Resultados de la Reperusión con t-PA.

| | MCAO | tPA 20min | tPA 3h | Reperusión Espontánea | No Reperusión |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------------|-----------------|
| Volumen de Infarto, % | $11,7 \pm 0,6$ | $7,8 \pm 0,4 *$ | $13,2 \pm 0,8$ | $6,6 \pm 1,5$ | $11,6 \pm 0,8$ |
| Déficit Neurológico, ptos | $5,1 \pm 0,3$ | $3,2 \pm 0,2 *$ | $5,4 \pm 0,2$ | $3,2 \pm 0,2$ | $5,2 \pm 0,6$ |
| Edema, % | $1,9 \pm 0,7$ | $2,6 \pm 0,7$ | $6,1 \pm 0,7 *$ | $1,8 \pm 0,3$ | $2,1 \pm 0,8$ |
| Área Hemorrágica, mm ² | $0,44 \pm 0,13$ | $0,18 \pm 0,03$ | $1,81 \pm 0,78 *$ | $0,11 \pm 0,03$ | $1,10 \pm 0,30$ |
| Volumen de Sangre, nl | $5,5 \pm 5,5$ | $0,0 \pm 0,0$ | $30,1 \pm 17,3 *$ | $4,0 \pm 4,0$ | $20,6 \pm 12,7$ |

Valores expresados como media \pm SEM.

* $p < 0,05$ vs grupo MCAO.

1.2.4. Efecto de la reperusión con t-PA sobre el daño a la BHE

El análisis macroscópico y microscópico reveló que prácticamente la totalidad de los animales del estudio presentaban signos de sangrado más o menos leve. Para evaluar este daño a la BHE, se realizó una cuantificación de los diferentes tipos de hemorragia encontrados, se determinaron el edema, el área hemorrágica, la cantidad de sangre extravasada y se realizó un estudio histológico de la hemorragia.

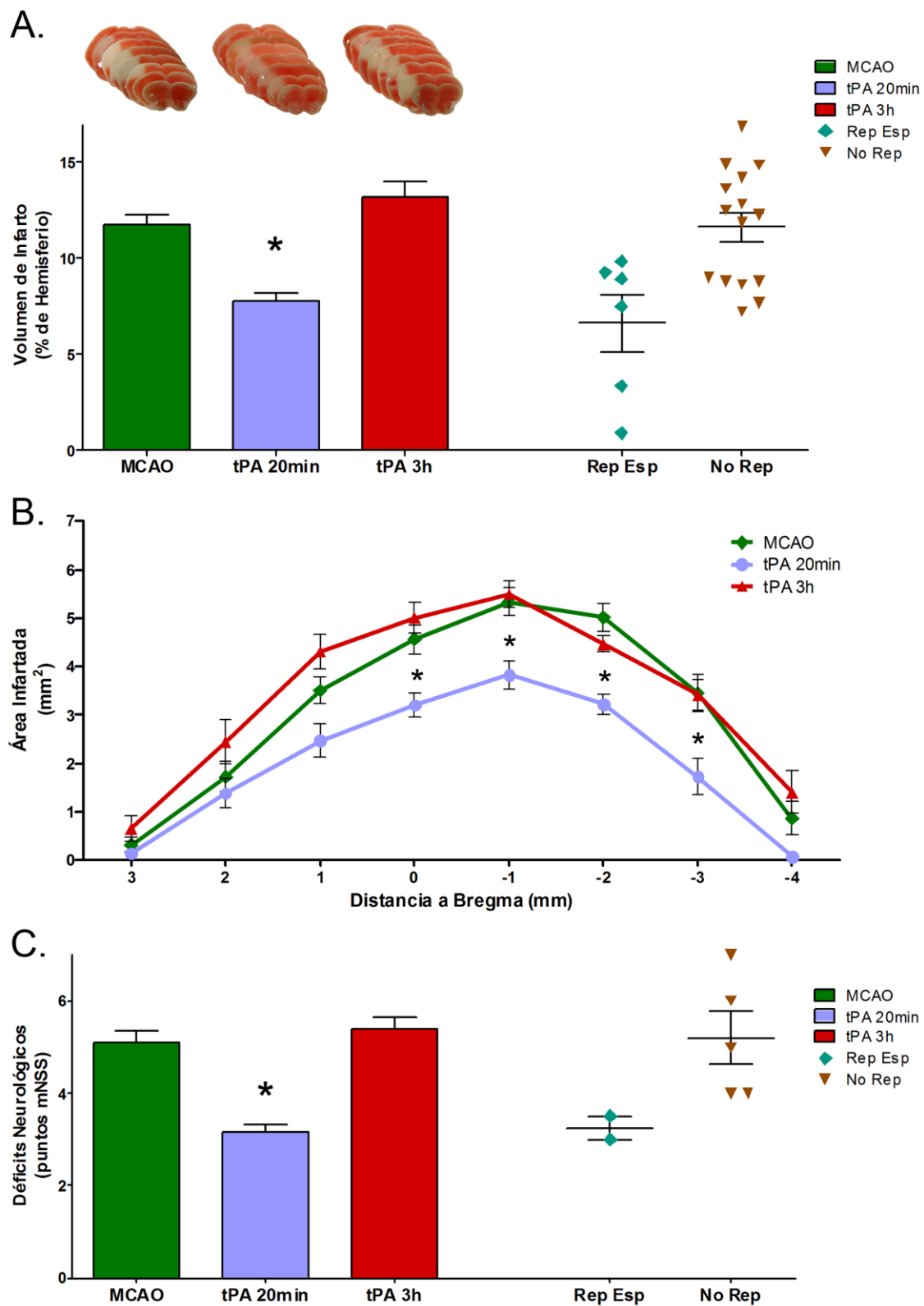


Figura 23. Efecto de la reperusión con t-PA sobre el daño cerebral. Datos representados como media \pm SEM; * $p < 0,05$ *vs* MCAO, $n = 6-15$. **A.** Volumen de infarto donde se muestran secciones representativas de los tres principales grupos. **B.** Distribución del infarto a lo largo del eje rostro-caudal. **C.** Síntomas neurológicos observados tras el infarto.

El grupo MCAO se caracterizó porque casi todos los animales mostraron un sangrado que podría calificarse de leve. El 46% de los animales mostraron HI-1, considerado irrelevante, y el restante 54% presentó un sangrado de mayor importancia (31% HI-2 y 23% PH-1, **Figura 24**). Pese a estos porcentajes, la cuantificación tanto del área hemorrágica (**Figura 25B**) como de la totalidad de sangre extravasada (**Figura 25C**) determinó que el sangrado del grupo MCAO no era de gran tamaño (**Figura 25, Tabla 10**). La imagen histológica de la hemorragia confirmó que, si bien existían clústeres de células rojas confluentes, estos se localizaban a lo largo de vasos de medio calibre del parénquima y su área e importancia eran irrelevantes (**Figura 26A y D**).

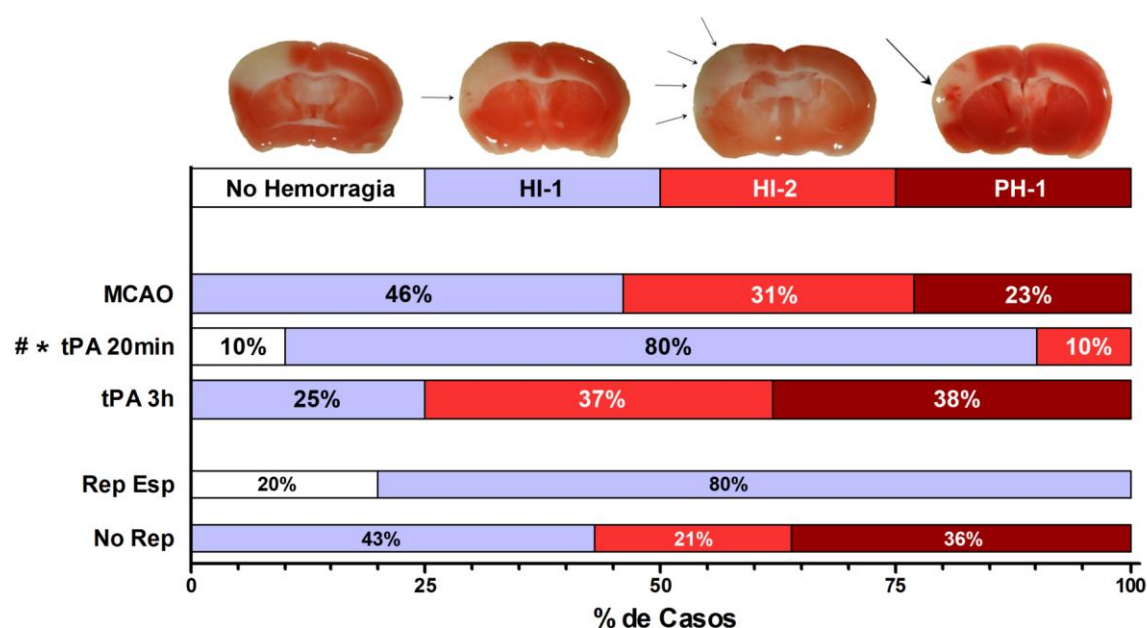


Figura 24. Efecto de la perfusión temprana y tardía con t-PA sobre la hemorragia. La clasificación se realizó atendiendo al tipo y extensión del sangrado en NH, no hemorragia; HI-1, infarto hemorrágico-1; HI-2, infarto hemorrágico-2, y PH-1, hemorragia parenquimal-1. * $p < 0,05$ vs MCAO; # $p < 0,05$ vs tPA 3h. $n = 5-14$.

La perfusión temprana con t-PA (grupo tPA 20min) logró disminuir de manera significativa la frecuencia de los sangrados más graves (10% de HI-2), aumentando en consecuencia los sangrados más pequeños (80% de HI-1, 10% no hemorragia, **Figura 24**). Del mismo modo, el área hemorrágica resultó menor a la observada en el grupo MCAO y no se detectó sangre extravasada (**Figura 25B y C, Tabla 10**). El examen microscópico mostró que aparecían sangrados muy pequeños y aislados en los márgenes de la zona lesionada (**Figura 26B y E**).

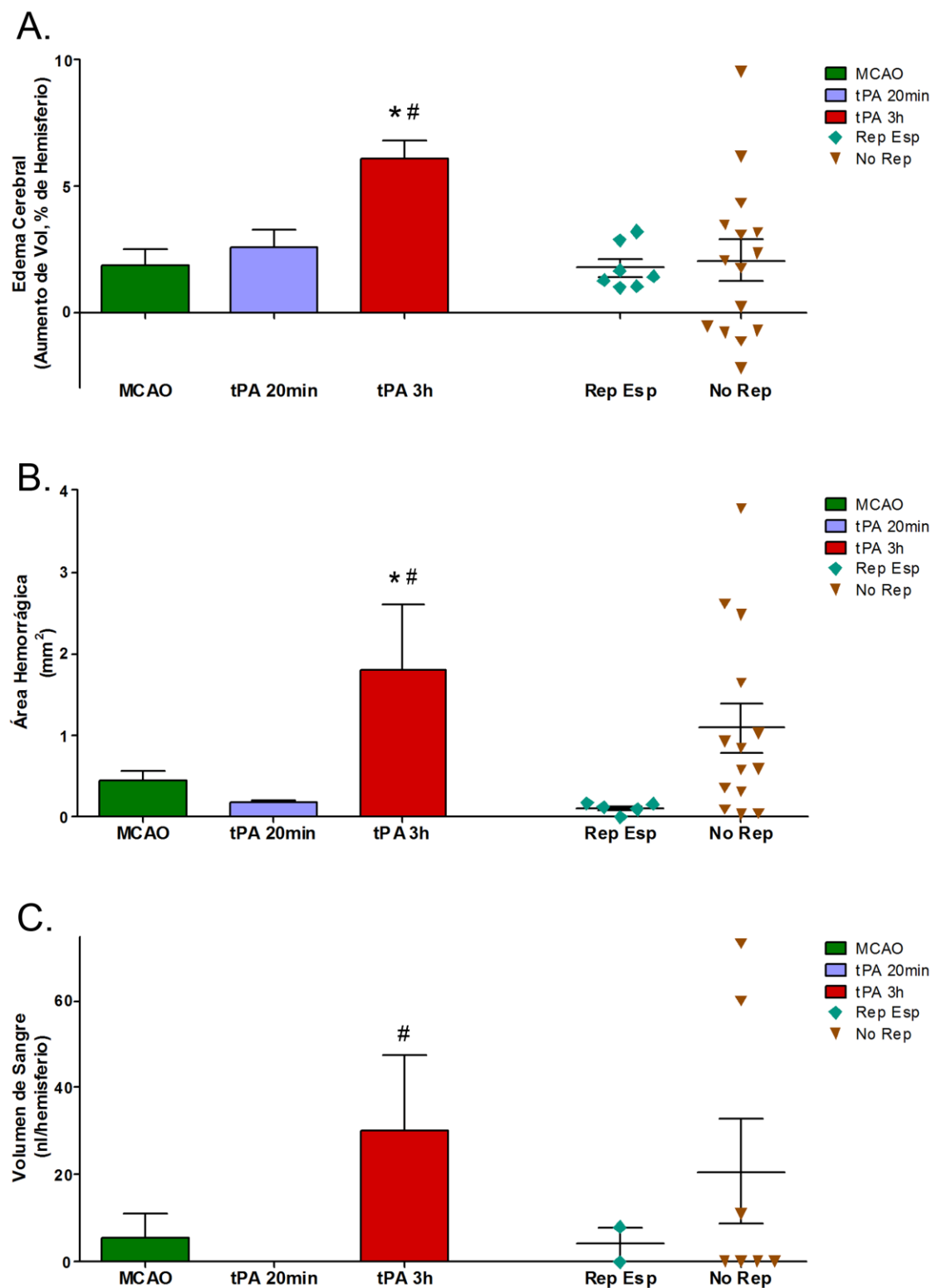


Figura 25. Efecto de la reperusión temprana y tardía con t-PA sobre el daño a la barrera hematoencefálica. Valores expresados como media \pm SEM; * $p < 0,05$ vs MCAO. A. Edema como aumento del volumen del hemisferio tras el infarto, $n=6-15$. B. Área hemorrágica, $n=5-14$. C. Volumen de sangre extravasado $n=2-7$.

Por el contrario, la reperfusión tardía con t-PA (grupo tPA 3h) provocó un aumento de los sangrados más graves y extensos (37% de HI-2, 38% de PI-1; **Figura 24**). De hecho, el área hemorrágica medida fue significativamente mayor ($p < 0,05$ vs MCAO y tPA 20min; **Figura 25B**), al igual que el volumen de sangre extravasado ($p < 0,05$ vs tPA 20min, **Figura 25C**) y el edema ($p < 0,05$ vs tPA 20min; **Figura 25A**, **Tabla 10**). El análisis histológico relevó que, efectivamente, se observaban grandes clústeres de células rojas extravasadas en el parénquima infartado (**Figura 26C y F**).

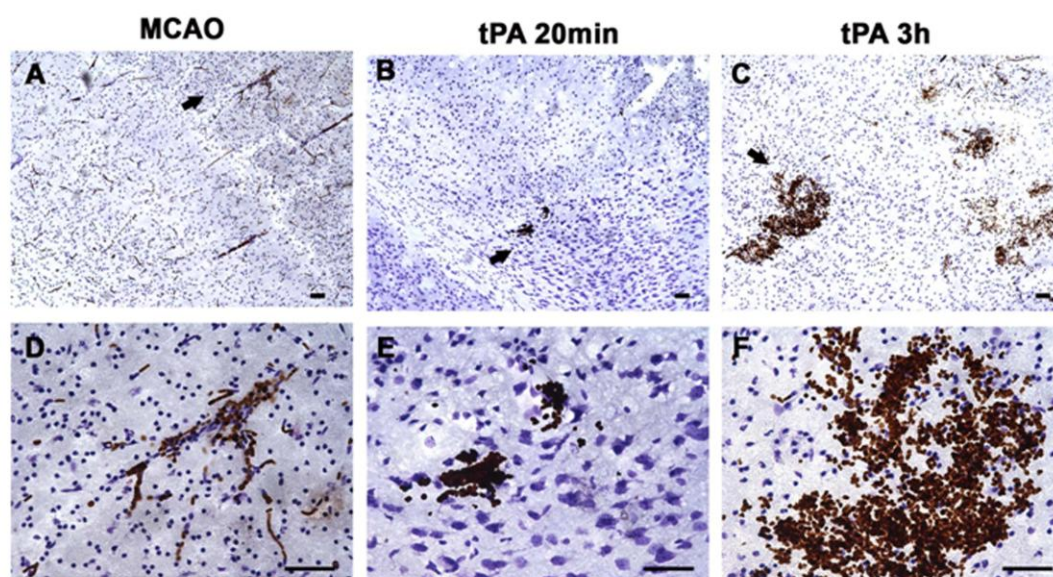


Figura 26. Estudio histológico de la hemorragia tras el tratamiento temprano o tardío con t-PA mostrando imágenes representativas de los grupos estudiados tras la tinción combinada de Nissl-DAB. **A y D**, grupo control MCAO; **B y E**, grupo tratado con t-PA a los 20 minutos de isquemia; **C y F**, grupo tratado con t-PA a las 3 horas de la oclusión. Barra de escala de 25 μ m.

El grupo Reperfusión Espontánea se caracterizó por presentar un tipo de hemorragia similar a la del grupo tPA 20min (80% HI-1, 20% no hemorragia, **Figura 24**). Tanto el volumen de sangre en parénquima como el área hemorrágica medida tuvieron valores semejantes a éste grupo (**Figura 25**, **Tabla 10**). Sin embargo, el grupo No Reperfusión presentó unos valores intermedios entre los del grupo MCAO y los del grupo tPA 3h (43% HI-1, 21% HI-2, 36% PH-1; **Figura 24**). Tanto el área de sangrado como el volumen de sangre en parénquima presentaron valores intermedios (**Figura 25**, **Tabla 10**).

1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1.3.1. Efecto sobre el daño neuronal

Para conocer la expresión y actividad de determinadas proteínas relacionadas con la BHE, se decidió tratar animales con t-PA o salino a las 2 h de isquemia y analizar dichas moléculas en el tejido a las 48 h. El primer paso era conocer la gravedad de la lesión, para lo que se determinó el volumen de infarto a las 48 h mediante la tinción de Nissl, y a las 24 y 48 h los déficits neurológicos mediante la escala mNSS y el *corner test*.

En este conjunto de experimentos, el 87% de los animales sufrió una oclusión estable tras la inyección de trombina, considerándose el 13% restante como reperusión espontánea. Los animales isquémicos tratados con salino (grupo MCAO) tuvieron una lesión de un volumen del $14,1 \pm 1,8\%$ de hemisferio.

El tratamiento con t-PA a las 2 h de la isquemia produjo una recanalización efectiva de la ACM en un 77% de los animales tratados (grupo tPA 2h). El tamaño del infarto fue similar al grupo MCAO ($16,0 \pm 1,2\%$ de hemisferio), igual que los síntomas neurológicos observados (Figura 27A y B).

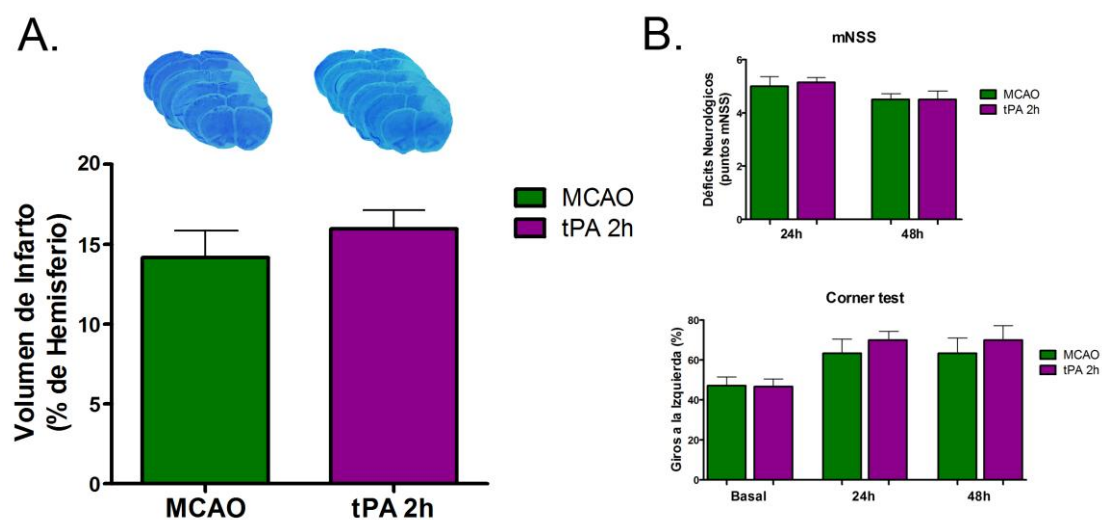


Figura 27. Daño neuronal tras la reperusión con t-PA a 2h. Datos representados como media \pm SEM. **A.** Volumen de infarto donde se muestran secciones representativas de los tres principales grupos, $n=8-10$. **B.** Síntomas neurológicos observados tras el infarto, $n=6$.

1.3.2. Efecto sobre el daño a la BHE

Para evaluar el daño a BHE, se determinó el edema y se realizó la tinción de eritrocitos, midiéndose el área hemorrágica y la densidad integrada de la señal, que da una idea de la cantidad de sangre extravasada.

De nuevo, el grupo MCAO presentó un daño ligero en la BHE, indicado por un edema moderado ($3,5 \pm 0,8\%$) y un sangrado leve. Sin embargo, la reperfusión con t-PA, incluso sólo 2 h después de la isquemia (grupo tPA 2h), produjo un mayor edema ($7,4 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$ vs MCAO, **Figura 28A**) y un mayor sangrado. Tanto el área de sangrado como la densidad integrada (señal total) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$ vs MCAO, **Figura 28B**).

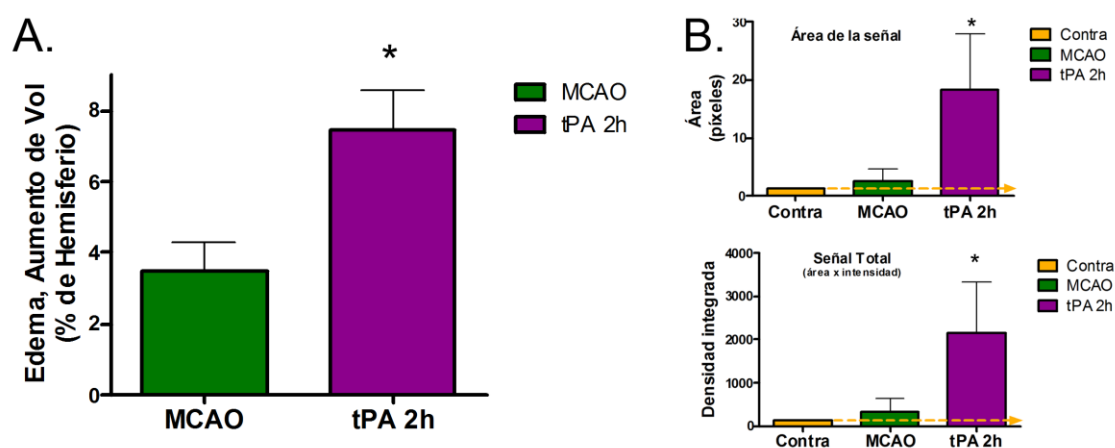


Figura 28. Disrupción de la BHE tras la reperfusión con t-PA a 2h. Datos representados como media \pm SEM; $p < 0,05$. **A.** Edema cerebral, medido en porcentaje de aumento de volumen, $n=8-10$. **B.** Hemorragia cerebral, expresada como área (arriba) o como densidad integrada (abajo), $n=6$.

1.3.3. Efecto del t-PA sobre la actividad gelatinasa

El análisis de la actividad gelatinasa, para conocer la implicación de las MMPs en el daño isquémico y a la BHE, demostró que las MMPs son principalmente activas en las células del tejido isquémico (**Figura 29A y B**). Tanto el área de marcaje como su intensidad fueron significativamente mayores respecto al resto de áreas estudiadas, periinfarto y contralateral. El tratamiento con t-PA a las 2 h no aumentó el área marcada, pero sí la intensidad de la señal (**Figura 29C**), lo que indica que el t-PA podría estar participando en la activación y/o expresión de MMPs.

En el periinfarto también se observó un aumento del área de la señal, pero no de la intensidad, respecto al contralateral, localizándose la fluorescencia principalmente en endotelio (Figura 29A y B). En este caso, la perfusión con t-PA no produjo ningún efecto aparente (Figura 29C).

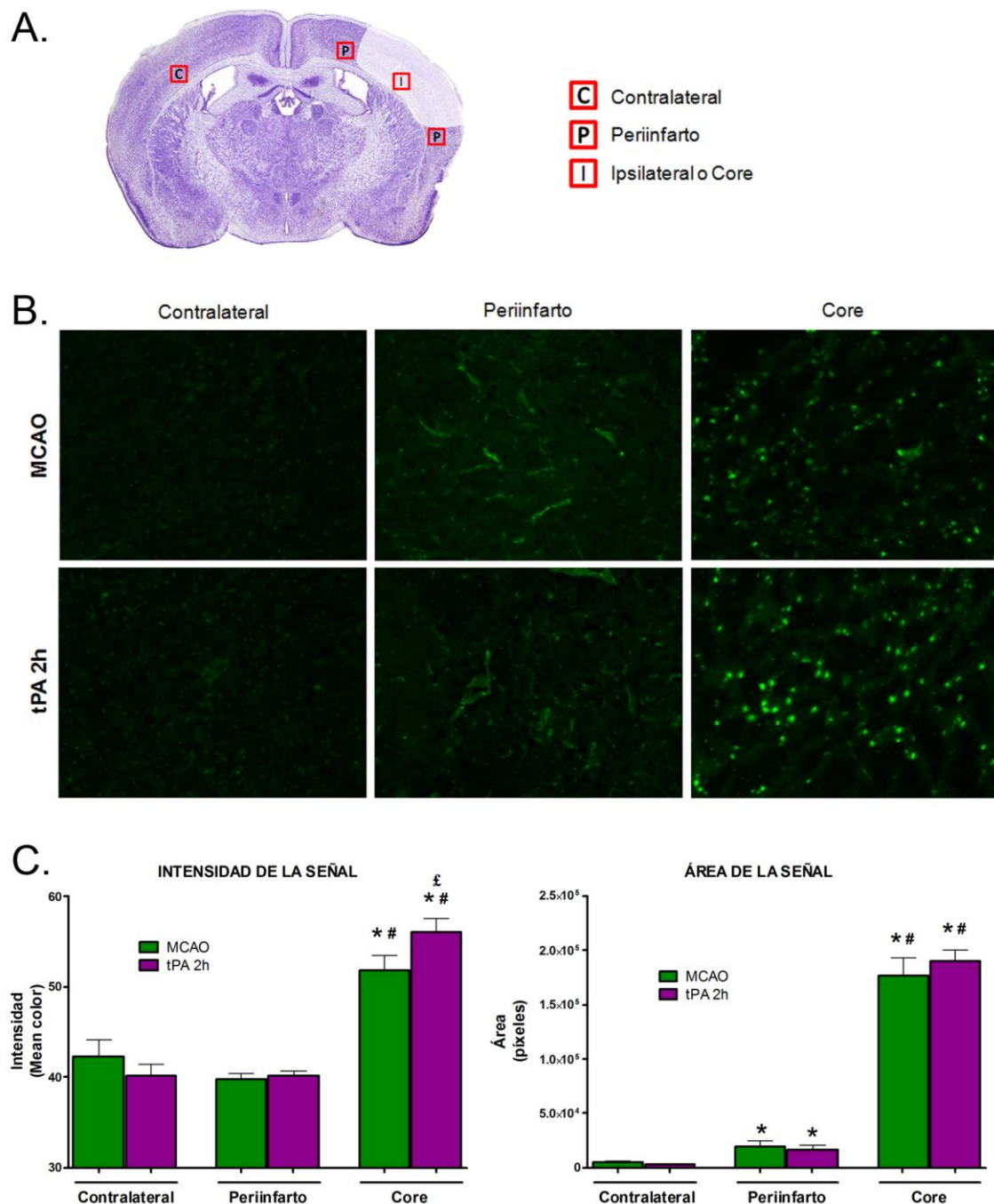


Figura 29. Actividad gelatinasa a 48 h post-isquemia. Datos representados como media \pm SEM; * $p < 0,05$ vs contralateral, # $p < 0,05$ vs periinfarto y £ $p < 0,05$ vs MCAO, $n = 6$. **A.** Esquema de las áreas de estudio fotografiadas. **B.** Fotos representativas de la actividad gelatinasa en las áreas y grupos de estudio. **C.** Densitometría de las imágenes, midiendo la intensidad y el área de la señal.

2. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

2.1. CINÉTICA DE LA FERRITINA SÉRICA

2.1.1. La ferritina sérica: efecto de la sobrecarga de hierro y de la isquemia cerebral

El análisis de la ferritina sérica a diferentes tiempos tras la isquemia (0, 3 y 24 h) demostró que, independientemente del modelo quirúrgico empleado o de la reperusión temprana o tardía, sus niveles permanecen bastante constantes, al menos, en las primeras 24 h después de la oclusión (**Figura 30**). Por lo tanto, ni la isquemia cerebral, ni la cirugía/anestesia, inducen su expresión.

Sin embargo, la concentración sérica fue completamente diferente entre los grupos controles (170 ± 19 ng/ml ó $100 \pm 11\%$) y los de sobrecarga de hierro ($380 \pm 20\%$, $p < 0,05$ vs control, **Figura 30**). Después de la isquemia y/o cirugía esta diferencia se mantuvo, lo que indica que la ferritina sérica sigue siendo, incluso después de la isquemia, un marcador fiable de los niveles de hierro en el organismo.

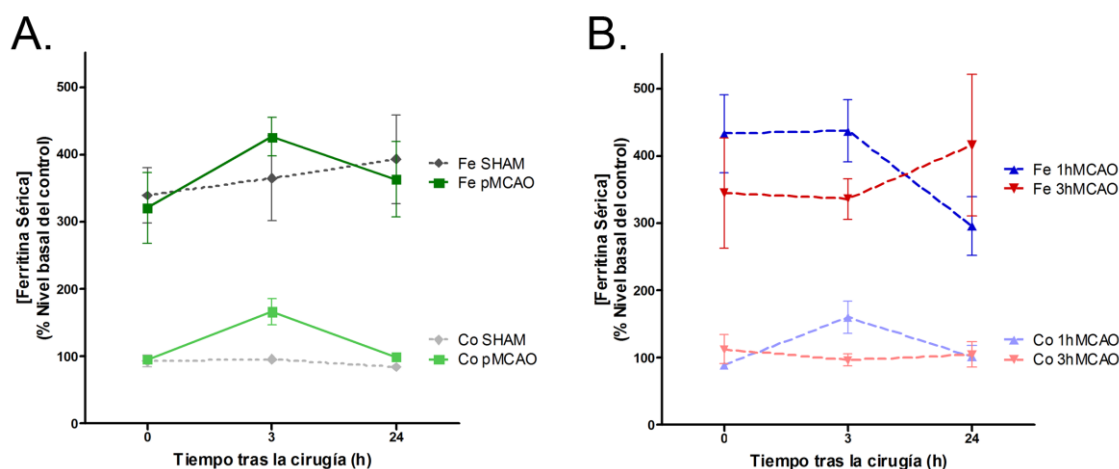


Figura 30. Cinética de la ferritina sérica: efecto de la isquemia y de la sobrecarga de hierro. Datos representados como media \pm SEM y en % respecto a los niveles basales de los controles, $n=4-6$. **A.** Concentración de la ferritina sérica en los grupos Sham y MCAO y **B.** en los grupos de isquemia transitoria. Fe indica sobrecarga de hierro y Co dieta control.

2.2. PAPEL DEL HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

2.2.1. Parámetros sanguíneos en los animales con sobrecarga de hierro

Los parámetros sanguíneos (pH, pCO₂ y pO₂, Htc, Hb y MABP) se midieron en animales con sobrecarga de hierro y en animales controles antes y 15 min después de la oclusión por ligadura. Los resultados mostraron que la sobrecarga de hierro no varió los parámetros basales y, además, tampoco varió la respuesta tras la isquemia (Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros sanguíneos en animales con sobrecarga de hierro y controles.

| | CONTROL | | SOBRECARGA DE HIERRO | |
|------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|
| | Basal | 15 min post | Basal | 15 min post |
| pH | 7,37 ± 0,06 | 7,28 ± 0,03 | 7,34 ± 0,03 | 7,30 ± 0,04 |
| pCO ₂ | 30,2 ± 2,7 | 34,7 ± 1,6 | 35,7 ± 1,7 | 30,9 ± 4,7 |
| pO ₂ | 161 ± 8 | 151 ± 17 | 167 ± 12 | 176 ± 24 |
| Htc | 36,2 ± 2,2 | 36,2 ± 1,8 | 37,0 ± 1,2 | 36,0 ± 2,0 |
| Hb | 12,3 ± 0,8 | 12,4 ± 0,5 | 12,6 ± 0,4 | 12,2 ± 0,6 |
| MABP | 73,6 ± 5,0 | 71,3 ± 4,3 | 67,8 ± 1,3 | 71,9 ± 6,5 |

Valores expresados como media ± SEM.

MABP indica presión arterial media (mm de Hg); pCO₂ y pO₂ son presiones parciales de dichos gases (mm de Hg); Htc, hematocrito (%); Hb, hemoglobina (mg/dl).

2.2.2. Efecto de la sobrecarga de hierro sobre el infarto

Los animales sometidos a isquemia permanente tuvieron el mismo volumen de infarto y semejantes deficiencias funcionales, tanto por el modelo tromboembólico (TIS MCAO), como por el de la ligadura (Lig MCAO) (14,2 ± 1,3% vs 14,7 ± 1,8%). La sobrecarga de hierro no alteró ni el tamaño de la lesión ni los síntomas observados en ninguno de los dos modelos (14,9 ± 1,3% y 15,4 ± 2,1% respectivamente, p>0,05 vs control, Figura 31, Tabla 12).

Cuando la reperusión se produjo a las 3 h (Lig 3h), la zona dañada fue la misma tanto en los animales control como en los que presentaban niveles altos de hierro (14,4 ± 1,2% vs 13,3 ± 1,8%). Además, tanto el infarto como las deficiencias se asemejaron a las que presentaron los animales sujetos a isquemia permanente (Figura 31A y B, Tabla 12).

Finalmente, cuando la oclusión de la arteria se produjo sólo durante 1 h (Lig 1h), la lesión a 24 h fue menor comparada con la que tuvieron los dos grupos de oclusión permanente (p<0,05 vs Lig MCAO y TIS MCAO). Sin embargo, en la reperusión

temprana, la sobrecarga de hierro se asoció a un mayor volumen de infarto que los controles ($11,4 \pm 1,6\%$ *vs* $5,5 \pm 1,2\%$, $p < 0,05$ *vs* control, **Figura 31A y B, Tabla 12**). No se encontraron diferencias claras entre los síntomas observados entre los diferentes grupos experimentales (**Figura 31C**).

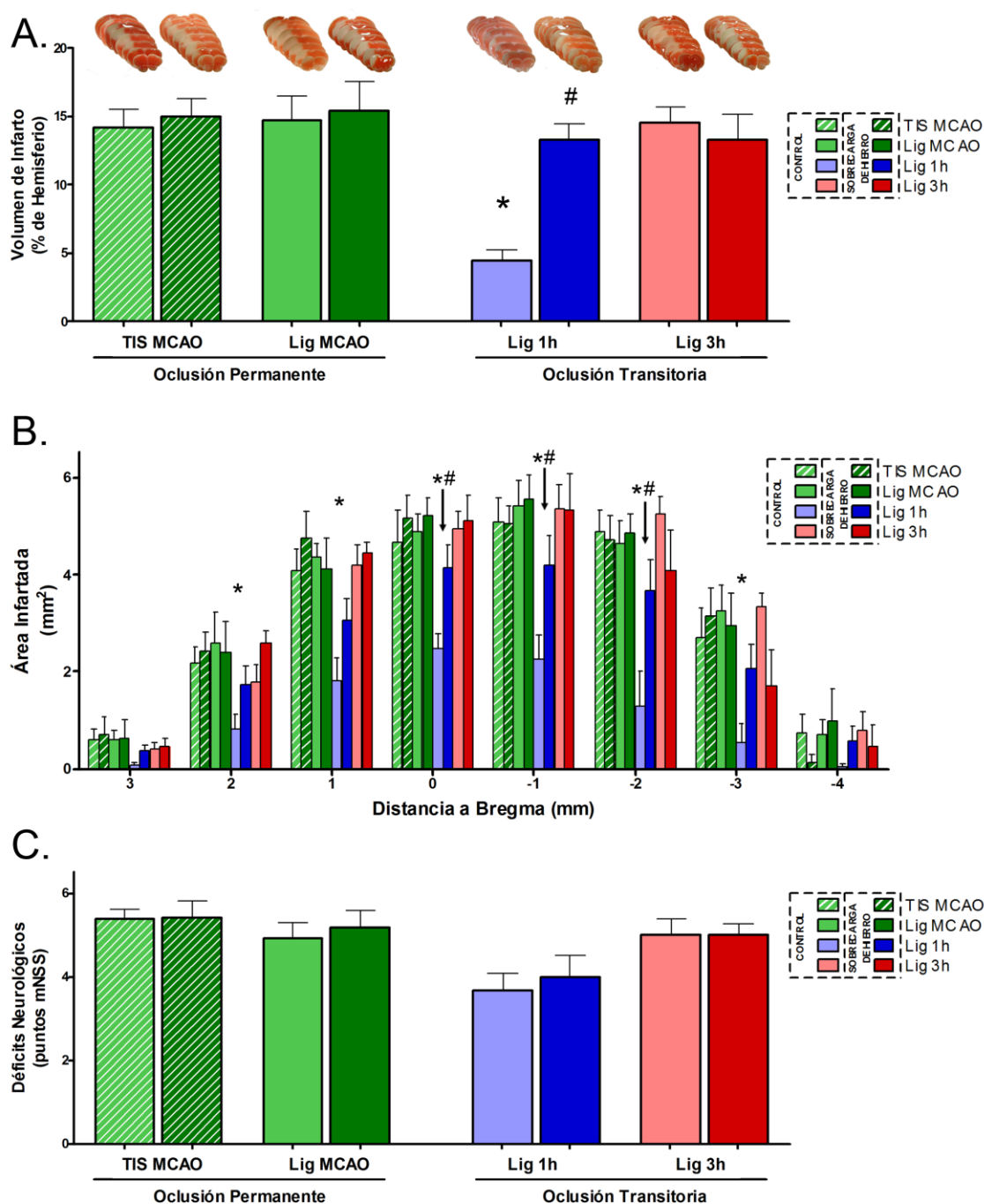


Figura 31. Efecto de la sobrecarga de hierro en el infarto empleando el modelo de ligadura. Datos representados como media \pm SEM, $n=5-11$; * $p < 0,05$ *vs* MCAO, # $p < 0,05$ *vs* control. **A.** Volumen de infarto con secciones representativas de TTC. **B.** Distribución del infarto a lo largo del eje rostro-caudal. **C.** Déficits neurológicos observados tras el infarto.

Además, de los animales sometidos al modelo TIS, 2/10 (20%) reperfundieron espontáneamente en el grupo de dieta control, mientras que 6/11 (55%) lo hicieron en el grupo con sobrecarga de hierro.

2.2.3. Efecto de la perfusión con t-PA sobre el daño a la BHE

Al analizar la hemorragia, se observó que, tras la isquemia permanente, se producían sangrados de leves a moderados, los cuales fueron mayores en el caso de la recanalización tardía ($p < 0,05$ vs TIS MCAO y Lig MCAO). La sobrecarga de hierro no modificó significativamente el área hemorrágica ni el edema, aunque existió una tendencia al incremento en este último (Figura 32A y B, Tabla 12).

Sin embargo, el grupo experimental sujeto a isquemia y perfusión temprana (Lig 1h) tuvo tanto un sangrado más leve como un edema menor (Figura 32, $p < 0,05$ vs TIS MCAO y Lig MCAO). En este caso, la sobrecarga de hierro aumentó ambos parámetros ($p < 0,05$ vs control).

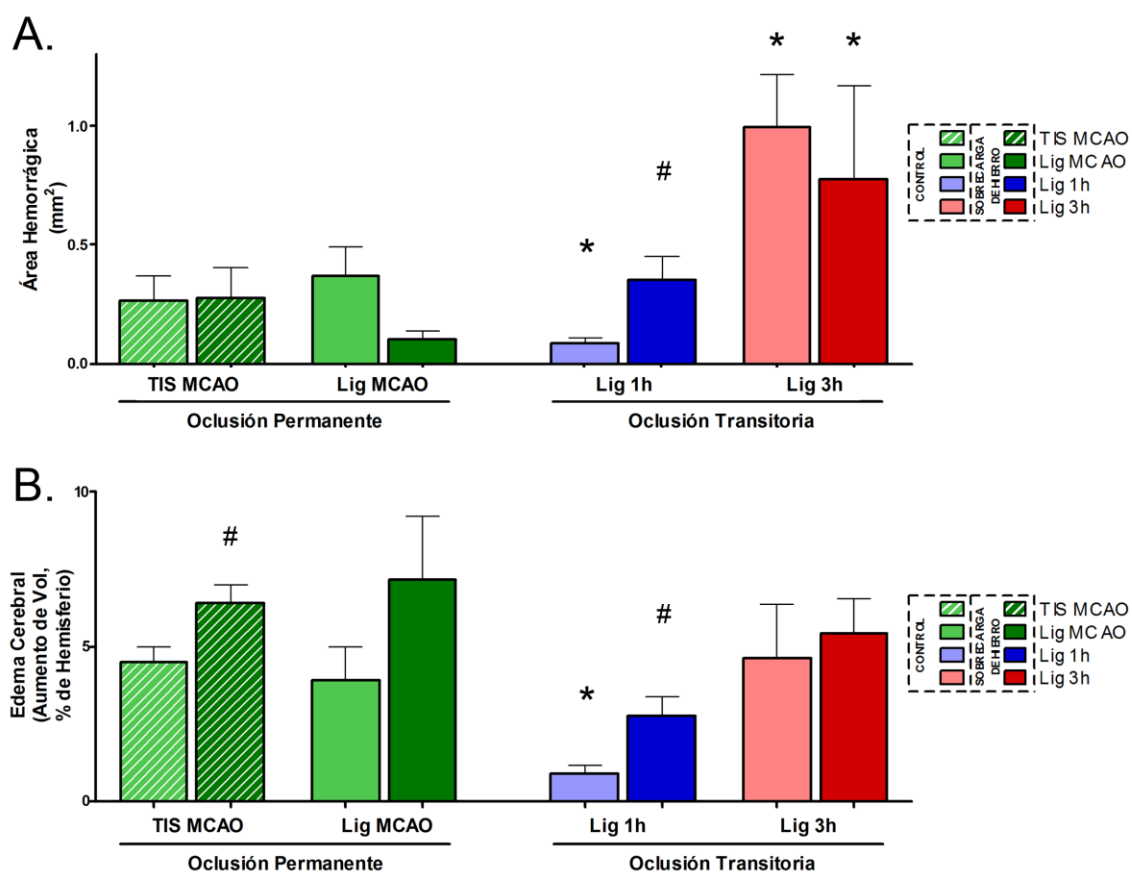


Figura 32. Efecto de la sobrecarga de hierro en la transformación hemorrágica. Datos representados como media \pm SEM, $n=5-11$; * $p < 0,05$ vs MCAO, # $p < 0,05$ vs control. A. Área hemorrágica. B. Edema cerebral.

Tabla 12. Resultados más importantes obtenidos tras la isquemia por ligadura de la ACM.

| | | TIS MCAO | Lig MCAO | Lig 1h | Lig 3h |
|---|----------------------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| VOLUMEN DE INFARTO (% hemisferio) | Control | 14,2 ± 2,9 | 14,7 ± 4,8 | 5,5 ± 3,9 * | 14,4 ± 3,2 |
| | Sobrecarga de Hierro | 14,9 ± 3,0 | 15,4 ± 5,1 | 11,4 ± 5,2 # | 13,3 ± 4,4 |
| DÉFICIT NEUROLÓGICO (puntos) | Control | 5,4 ± 0,5 | 4,9 ± 0,9 | 3,7 ± 1,0 | 5,0 ± 0,9 |
| | Sobrecarga de Hierro | 5,4 ± 0,9 | 5,2 ± 1,0 | 4,0 ± 1,3 | 5,0 ± 0,6 |
| EDEMA CEREBRAL (% hemisferio) | Control | 3,6 ± 2,2 | 2,9 ± 3,5 | 1,1 ± 1,0 * | 3,8 ± 4,8 |
| | Sobrecarga de Hierro | 5,3 ± 2,5 | 5,9 ± 5,2 | 2,6 ± 1,9 # | 5,4 ± 2,7 |
| ÁREA HEMORRÁGICA (mm ²) | Control | 0,27 ± 0,23 | 0,37 ± 0,32 | 0,11 ± 0,11 * | 1,00 ± 0,54 * |
| | Sobrecarga de Hierro | 0,49 ± 0,54 # | 0,30 ± 0,49 | 0,32 ± 0,32 # | 0,78 ± 0,95 * |

Valores expresados como media ± SEM.

* p<0,05 *vs* grupos TIS y Lig MCAO.

p<0,05 *vs* grupo control.

2.3. PAPEL DEL HIERRO EN LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

2.3.1. Consideraciones generales: porcentajes de supervivencia y éxito

Tras explorar el efecto de la sobrecarga de hierro en la isquemia empleando el modelo de ligadura, comenzó a estudiarse el efecto de dicha sobrecarga en el fenómeno de TH. Para tal efecto se empleó el modelo TIS y diferentes tiempos de administración de t-PA (20 min, 1 y 3 h).

En estos experimentos, la inyección de trombina (2 UI/μl) indujo un coágulo estable, caracterizado según los criterios visuales y de láser-doppler ya definidos, en el 98,5% de los animales con dieta control. Este porcentaje fue menor, 91,4%, en el grupo con sobrecarga de hierro (**Figura 33**), descartándose, en ambos casos, los animales con **Reperusión Espontánea** de todas las determinaciones posteriores.

Además, el tratamiento con t-PA a los 20 min de la oclusión logró una recanalización arterial exitosa en el 56,3% de los animales con niveles normales de hierro, siendo el porcentaje considerablemente mayor, 90%, en los animales con sobrecarga de hierro. En los grupos t-PA 1h, los porcentajes de reperusión fueron del 64,3% y 92,3% en los grupos con dieta estándar y con dieta enriquecida en hierro, siendo del 47,1% y 81,8% en dichos grupos de alimentación cuando se administró el t-PA 3 h tras la oclusión. En todos los casos (**Figura 33**), los animales de **No Reperusión** fueron excluidos de todas las determinaciones posteriores. Por lo tanto, comparados con

animales controles, los de sobrecarga oral de hierro reperfundieron con más facilidad (55,3% *vs* 88,2%, $p < 0,05$).

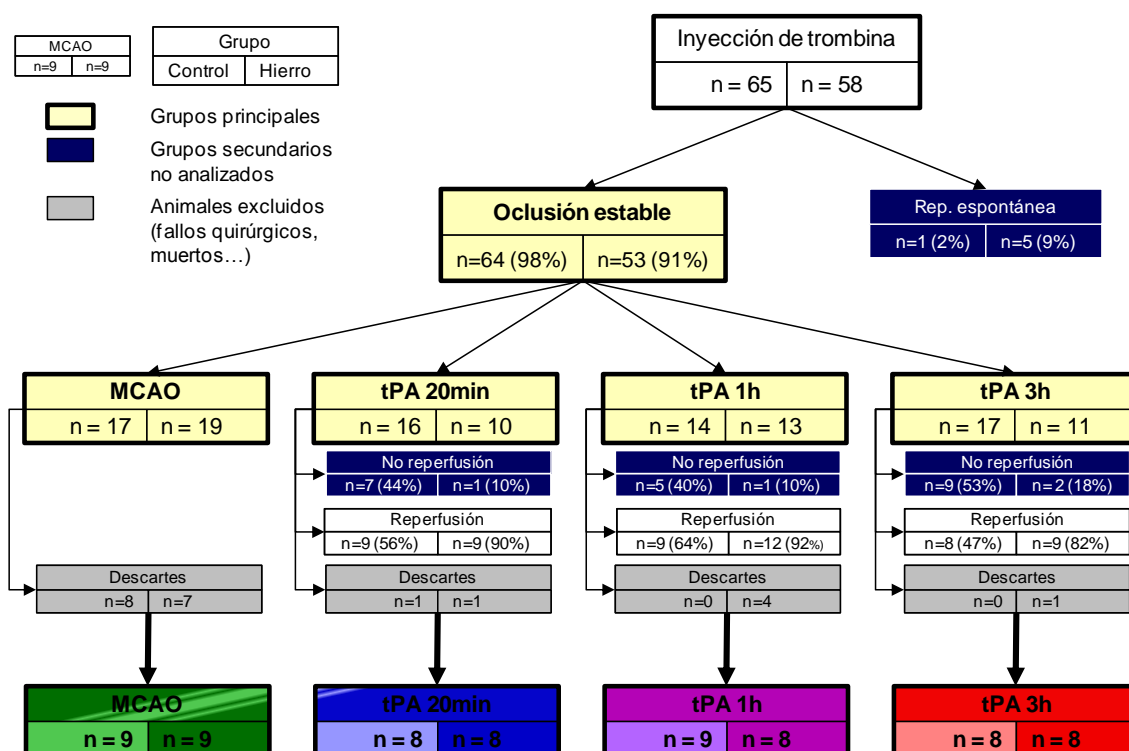


Figura 33. Cuadro explicativo de las consideraciones generales del modelo TIS, en el que se aprecian los porcentajes de oclusión, reperusión, supervivencia y éxito del modelo.

Además, la reperusión ocurrió más tardíamente tras la administración de t-PA en los animales con dieta estándar que con dieta rica en hierro ($51,4 \pm 10,6$ min *vs* $38,8 \pm 5,5$ min para tPA 20min, $p > 0,05$, **Figura 34B y C**; $87,5 \pm 7,7$ min *vs* $41,2 \pm 8,3$ min, $p < 0,05$ para tPA 1h, **Figura 34D y E**; $83,8 \pm 12,7$ min *vs* $45,0 \pm 12,3$ min, $p < 0,05$ para tPA 3h, **Figura 34F y G**). De forma global, los animales controles reperfundieron $75,2 \pm 6,7$ min tras la administración del fibrinolítico, mientras los animales con niveles altos de hierro lo hicieron sólo $41,4 \pm 4,7$ min tras el t-PA ($p < 0,05$).

Finalmente, pese a obtener de nuevo una supervivencia por encima del 95%, la exclusión de muchos de los animales controles porque no reperfundieron tras la administración del fibrinolítico, hizo que el porcentaje de éxito global del modelo fuera del 75%.

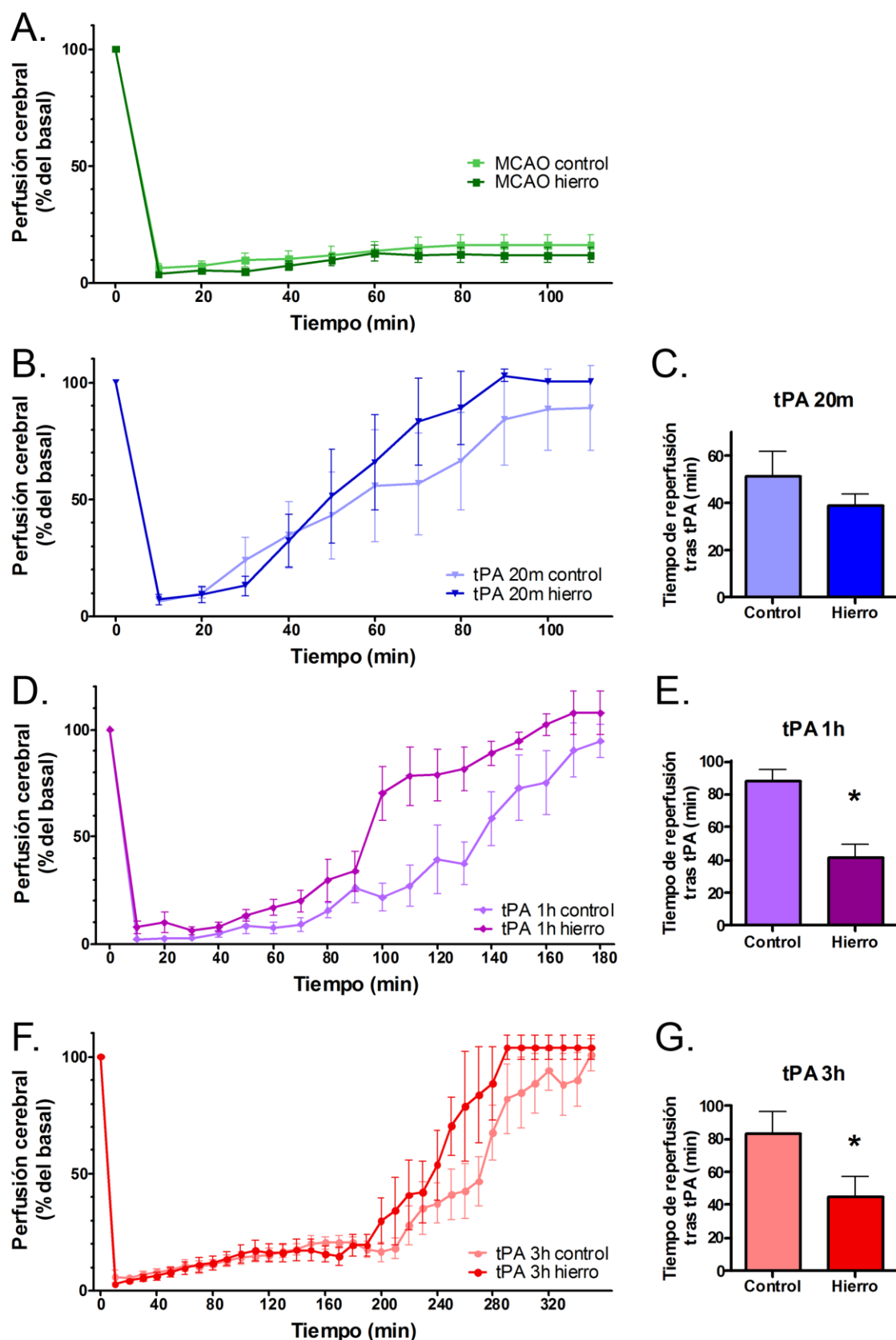


Figura 34. Registros láser-doppler de cada grupo experimental, junto al tiempo promedio de reperusión: A. MCAO, B. y C. tPA 20min, D. y E. tPA 1h y F. y G. tPA 3h. Datos representados como media \pm SEM, n=8; * p<0,05 *vs* control.

2.3.2. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión sobre el volumen de infarto

Con el fin de conocer la extensión del daño en los diferentes grupos experimentales se evaluó, 24 h tras la isquemia, el volumen de infarto mediante la tinción de Nissl.

Los animales sometidos a isquemia permanente presentaron un volumen de infarto semejante en los controles y los de sobrecarga de hierro ($16,2 \pm 1,0\%$ de hemisferio *vs* $18,1 \pm 1,4\%$ de hemisferio, $p > 0,05$, **Figura 35**). Frente a esta lesión, la reperusión temprana, grupos tPA 20min, produjo un infarto de menor tamaño tanto en los controles ($6,9 \pm 1,0\%$ de hemisferio, $p < 0,05$ *vs* MCAO) como en los de niveles altos de hierro ($11,0 \pm 2,1\%$ de hemisferio, $p < 0,05$ *vs* MCAO, **Figura 35**). Además, a este tiempo de reperusión, la lesión fue significativamente mayor en los animales con sobrecarga ($p < 0,05$ *vs* control). La recanalización algo más tardía, grupos tPA 1h, sólo produjo un infarto significativamente menor que la isquemia permanente en los animales con niveles normales de hierro ($11,2 \pm 0,8\%$ de hemisferio, $p < 0,05$ *vs* MCAO), mientras que los animales con niveles altos de hierro presentaron una lesión significativamente mayor ($17,7 \pm 2,1\%$ de hemisferio, $p < 0,05$ *vs* control, **Figura 35**), pese a que el tiempo real de oclusión fue considerablemente menor porque reperfundieron más rápidamente. Finalmente, los grupos de fibrinólisis tardía, tPA 3h, presentaron una lesión semejante que isquemia permanente ($18,7 \pm 1,4\%$ de hemisferio y $21,0 \pm 1,0\%$ de hemisferio respectivamente para dieta control y rica en hierro, $p > 0,05$, **Figura 35**).

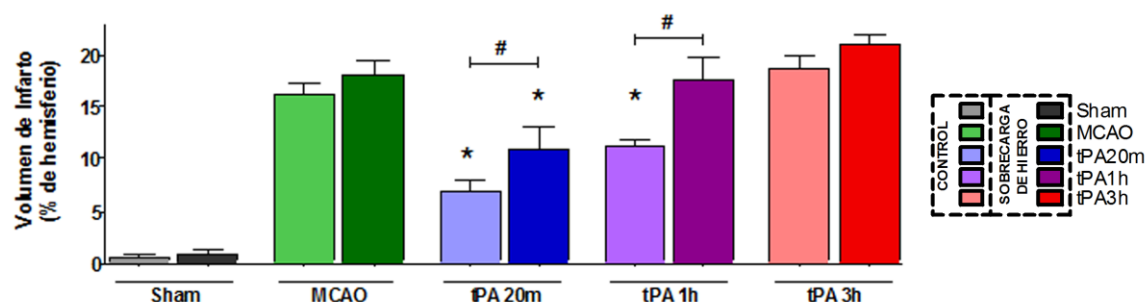


Figura 35. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión en el volumen de infarto empleando el modelo TIS. Datos representados como media \pm SEM, $n=8$; * $p < 0,05$ *vs* MCAO, # $p < 0,05$ *vs* dieta control.

2.3.3. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión sobre el daño a la BHE

La evaluación del daño a la BHE se realizó mediante la medición del edema cerebral, la clasificación de la hemorragia y la medición de su volumen tras la tinción de

las peroxidasas endógenas (volumen ocupado por eritrocito extravasado) y mediante la extravasación de IgG, que permite conocer la integridad de la BHE.

La determinación del edema cerebral, medido como el aumento del volumen del hemisferio lesionado, mostró que todos los grupos experimentales presentaban unos valores similares, entre un 8% y un 4%, existiendo una tendencia a reducirse en los grupos de perfusión temprana con dieta estándar (tPA 20min y tPA 1h, $p < 0,1$ vs MCAO, **Figura 36A**). Además, la sobrecarga oral de hierro aumentó significativamente el edema tras la administración de t-PA 1 h post-isquemia (tPA 1h, $p < 0,05$ vs control). La perfusión tardía provocó un mayor edema cerebral tanto en los animales con sobrecarga de hierro como en los controles (tPA 3h, $p < 0,05$ vs MCAO).

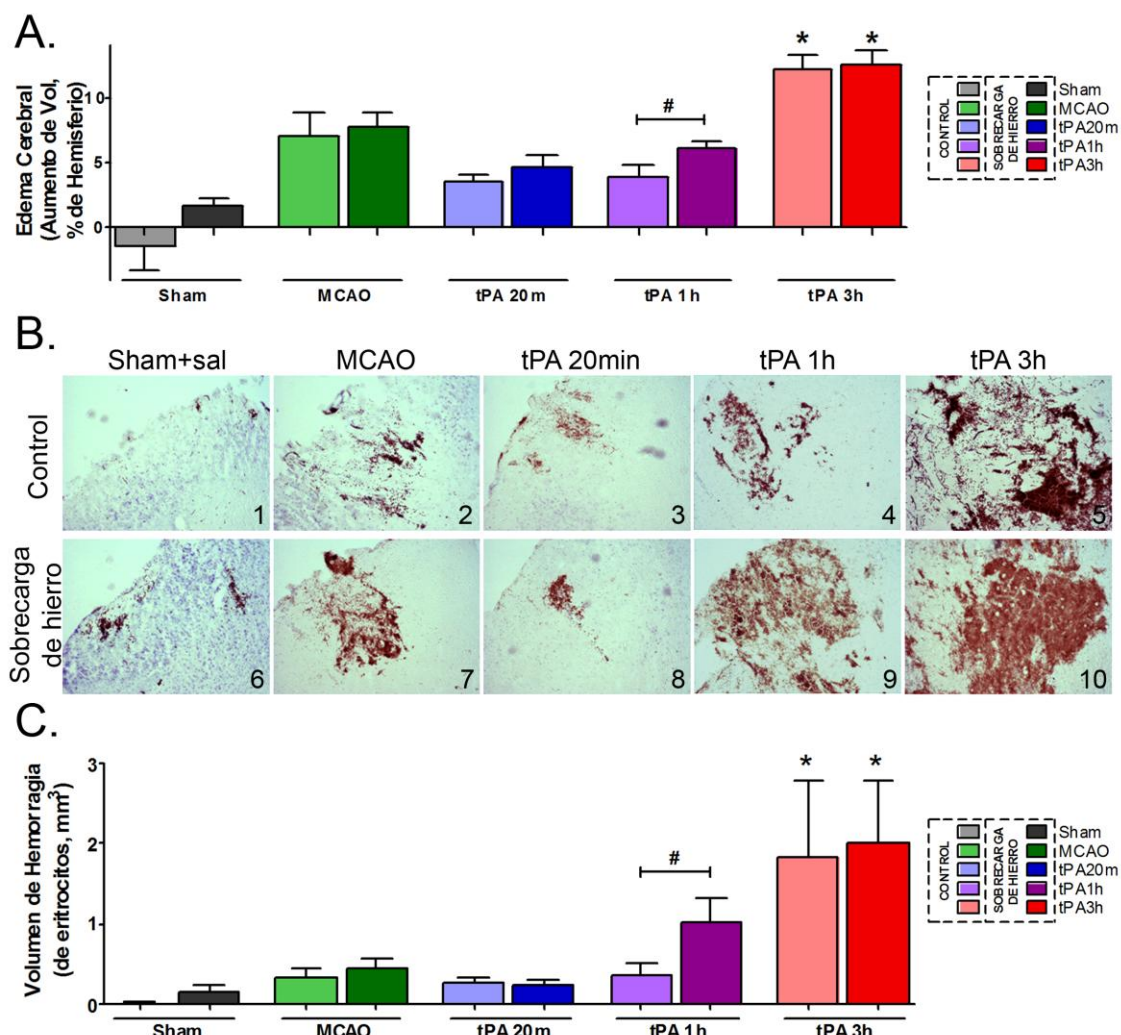


Figura 36. Efecto de la sobrecarga de hierro y la perfusión en el daño a BBE. Datos representados como media \pm SEM, $n=8$; * $p < 0,05$ vs MCAO, # $p < 0,05$ vs dieta control. **A.** Edema cerebral. **B.** Fotos representativas de los sangrados típicos de cada grupo experimental. **C.** Área hemorrágica.

La tinción de los eritrocitos permitió la observación del sangrado, la determinación de su volumen y su clasificación, mostrándose que los animales sometidos a la cirugía pero no a la isquemia, grupos Sham, presentaban una ligera lesión superficial que en muy raras ocasiones se acompañaba de sangrados (**Figura 36B y C**) y, si éstos se producían, eran pequeñas petequias localizadas en las últimas capas de la corteza (**Figura 37**). Los grupos MCAO presentaron un sangrado más notable (**Figura 36B y C**) que, en un 30-40% fue de tipo moderado o HI-2, caracterizado por la presencia de petequias más confluentes en la zona de la lesión (**Figura 37**).

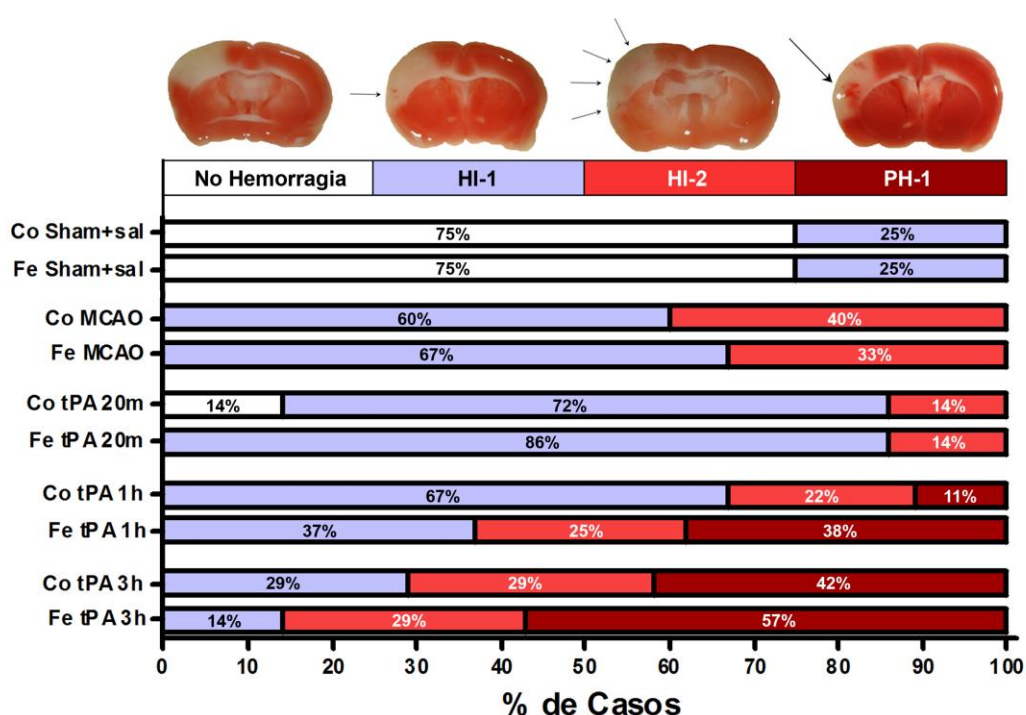


Figura 37. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión sobre la clasificación histológica de la hemorragia. La clasificación se realizó atendiendo al tipo de sangrado en NH, no hemorragia; HI-1, infarto hemorrágico-1; HI-2, infarto hemorrágico-2, y PH-1, hemorragia parenquimal-1.

La reperusión temprana (tPA 20min) disminuyó, respecto a la isquemia permanente, la gravedad de los sangrados (HI-2 14%, **Figura 37**), aunque el volumen medido no varió significativamente (**Figura 36B y C**). Los grupos tPA 1h también presentaron valores semejantes a los MCAO, aunque la sobrecarga de hierro indujo un aumento del sangrado respecto a los controles ($p < 0,05$ *vs* control, **Figura 36B y C**). La observación histológica también mostró que la sobrecarga de hierro aumentaba la gravedad del sangrado tras el tratamiento con tPA 1h (67% HI-2 y PH-1, **Figura 37**).

La reperusión tardía (tPA 3h) provocó un aumento claro del volumen de hemorragia en ambos grupos de dieta, presentándose los sangrados en situación más profunda, cerca del cuerpo calloso (**Figura 36 B y C**) y siendo entre un 70-85% de tipo más grave, HI-2 y PH-1 (**Figura 37**), caracterizado por la presencia de grandes clústeres de eritrocitos.

Finalmente, para evaluar la funcionalidad de la BHE se realizó la tinción con fluorescencia de la IgG extravasada del propio plasma, cuantificándose por densitometría (**Figura 38A**). Los datos mostraron que todos los grupos experimentales presentaron una alteración de la BHE similar, en la zona comprometida por la isquemia, siendo significativamente más alta en los grupos de tPA 3h, independientemente de los niveles de hierro ($p < 0,05$ vs MCAO, **Figura 38B**).

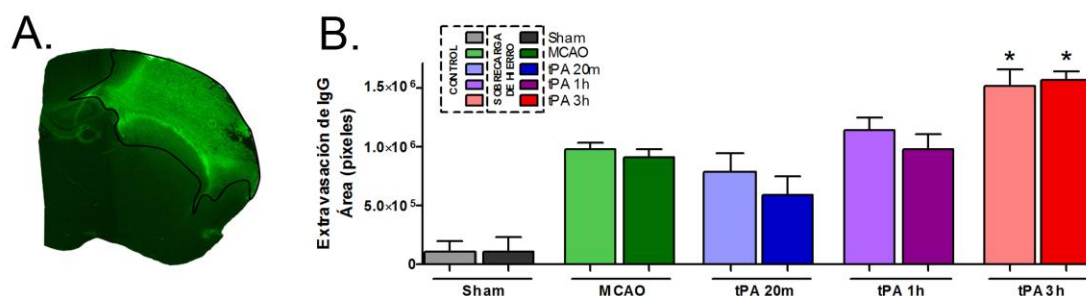


Figura 38. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión sobre la extravasación de IgG. A. Imagen representativa de la técnica. B. Área de extravasación. Datos representados como media \pm SEM, n=4; * $p < 0,05$ vs MCAO, # $p < 0,05$ vs dieta control.

2.3.4. Efecto de la sobrecarga de hierro y la reperusión sobre mediadores de la TH

Debido a que los datos previos sugerían que los animales con niveles altos de hierro podrían ser más susceptibles al daño isquémico, perdiendo los efectos beneficiosos del t-PA antes que los animales controles y sangrando a tiempos de reperusión anteriores, nos planteamos estudiar el estado de alguno de los mediadores de la TH. Entre ellos, elegimos estudiar el número de neutrófilos infiltrados, cuantificados como el número de células NIMP-R14⁺, y los niveles de MMP-9, por densitometría, empleando inmunohistoquímica para ambas determinaciones.

En el conteo de las células NIMP-R14⁺ se observó que todos los grupos presentaban valores similares de infiltración, claramente diferentes de los animales Sham, en donde apenas se contaron células positivas (**Figura 39A y B**). Las únicas diferencias se observaron en los grupos tPA 3h, en donde la reperusión tardía incrementó claramente

el número de neutrófilos ($p < 0,05$ *vs* MCAO, **Figura 39A y B**). Además, todos los grupos con niveles elevados de hierro presentaron valores superiores a los de su respectivo control ($p < 0,05$ *vs* control, **Figura 39A y B**).

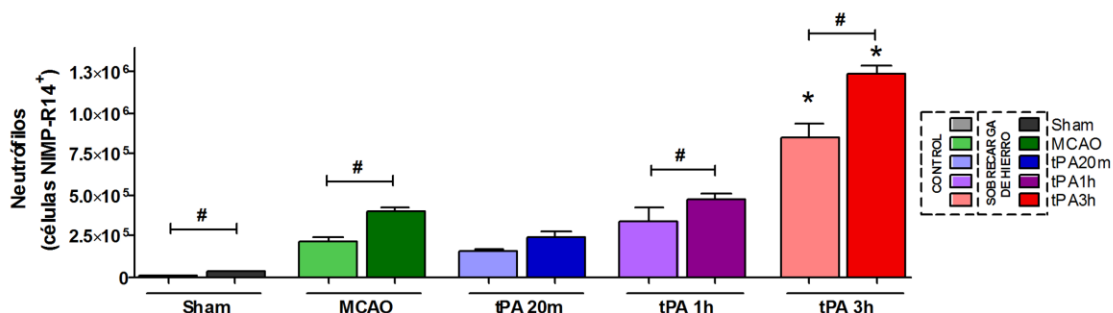


Figura 39. Infiltración de neutrófilos tras la isquemia. Contaje de células NIMP-R14⁺ en el hemisferio infartado. Datos representados como media \pm SEM, $n=4$; * $p < 0,05$ *vs* MCAO, # $p < 0,05$ *vs* dieta control.

Por último, la densitometría tras la inmunofluorescencia de MMP-9 no mostró una inducción clara de esta proteasa ni tras la isquemia ni tras el tratamiento con t-PA en ninguno de los grupos estudiados, pero sí se observó una tendencia a una mayor expresión en aquellos animales sometidos a la administración tardía de t-PA (tPA 3h, $p < 0,1$ *vs* MCAO) que, además, fueron los que experimentaron una clara TH.

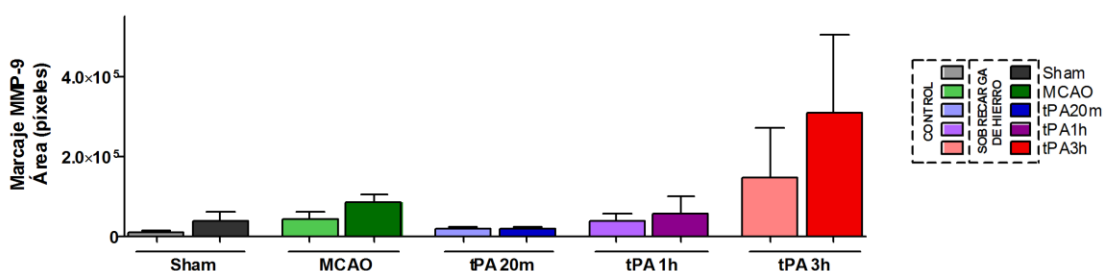


Figura 40. Expresión de MMP-9 tras la isquemia. Densitometría de la expresión proteica. Datos representados como media \pm SEM, $n=4$.

2.4. MARCADORES SANGUÍNEOS DE LA TH E IMPLICACIÓN DEL HIERRO

2.4.1. Marcadores explorados

En la clínica, los marcadores sanguíneos de TH y/o de daño isquémico son enormemente importantes, ya que pueden ayudar a identificar rápidamente aquellos

pacientes que más beneficio pueden obtener de la terapia trombolítica y aquellos más propensos a sufrir complicaciones como la TH. Para conocer el perfil temporal de algunos posibles marcadores de TH o de daño isquémico, se analizaron sus niveles séricos en animales sometidos a isquemia permanente y tratados con t-PA a diferentes tiempos (tPA 20min, tPA 1h y tPA 3h). Al mismo tiempo, se determinó si los niveles altos de hierro alteraban el perfil de estas moléculas en animales con sobrecarga de hierro. Los marcadores elegidos fueron, en primer lugar, MMP-2, proteasa de matriz extracelular que ha sido implicada en el daño a BHE; c-Fn, proteína de la MEC que aparece en sangre cuando se degrada y que ha sido descrita como marcador de TH, y MDA, molécula lipídica que indica daño por estrés oxidativo, proceso que podría estar exacerbado en los animales con niveles altos de hierro sometidos a isquemia.

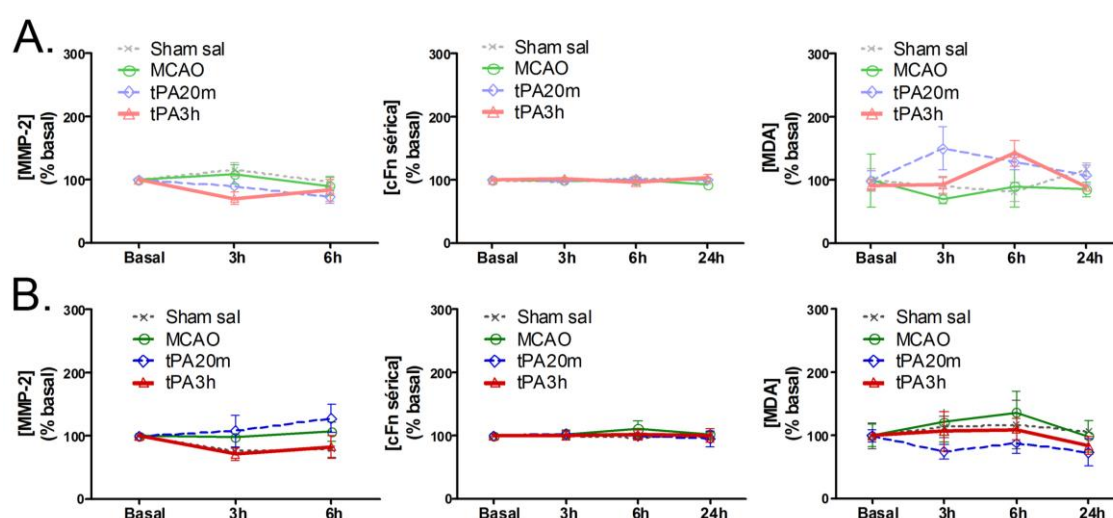


Figura 41. Niveles de MMP-2, c-FN y MDA en las primeras 24 h tras la isquemia. A. Niveles en animales controles, **B.** Niveles en animales con sobrecarga de hierro. Datos representados como media \pm SEM.

Los resultados mostraron que ninguna de dichas moléculas se alteraba de forma significativa durante las primeras 24 h tras la isquemia. Por lo tanto, ninguno de los grupos experimentó variaciones destacables en los marcadores estudiados (no más de un 50% en el mejor de los casos) ni tras la isquemia, ni tras el tratamiento trombolítico, ni tan siquiera en los animales que desarrollaron TH (**Figura 41**). Además, los valores basales de MMP-2 y c-Fn fueron similares en los animales con sobrecarga oral de hierro y sus respectivos controles, indicando que la dieta enriquecida no alteraba de forma significativa ninguna de las dos proteínas (MMP-2: 573 ± 32 ng/ml vs 484 ± 35 ng/ml,

$p > 0,05$; c-Fn: 2379 ± 84 ng/ml *vs* 2242 ± 97 ng/ml, $p > 0,05$). Sin embargo, los niveles basales del marcador de estrés oxidativo MDA fueron significativamente superiores en los animales con sobrecarga de hierro que en los controles ($16 \pm 1 \mu\text{M}$ *vs* $20 \pm 1 \mu\text{M}$, $p < 0,05$, datos no representados), indicando que los primeros probablemente presentaban un mayor daño por radicales libres previo a la isquemia.

2.4.2. La MMP-9 como marcador de TH

El último de los marcadores estudiados fue la MMP-9, quizá la proteasa que más ha sido implicada en el daño a la BHE. En este caso, se determinaron en las primeras 24 h tras la isquemia tanto sus niveles séricos como su actividad mediante ELISA y zimografía, respectivamente.

Los resultados mostraron que la isquemia no alteraba de forma significativa los niveles proteicos en las primeras 24 h, ya que no se observó variación alguna en los grupos MCAO a los tiempos estudiados. Sin embargo, sí que se encontró que la concentración sérica de MMP-9 aumentaba en los grupos reperfundidos con t-PA, incrementándose poco después de la administración del tratamiento tanto en animales controles como con sobrecarga de hierro (a 3 h en tPA 20min y tPA 1h, $p < 0,05$ *vs* 3 h MCAO, **Figura 42A**). Esta elevación fue transitoria, no dándose ni a 6 ni a 24 h. La única diferencia entre animales controles y con niveles altos de hierro fue que, en el grupo tPA 20min y a las 24 h, los controles presentaron una concentración de MMP-9 similar a la basal y significativamente mayor en la dieta rica en hierro, donde no se observó descenso de los niveles proteicos en los tiempos más tardíos (a 24 h en tPA 20min $p < 0,05$ *vs* sobrecarga de hierro, **Figura 42A**).

Además, en los grupos de perfusión tardía, el t-PA se administró después de la primera extracción sanguínea, por lo que los niveles de MMP-9 se indujeron más tardíamente. Éstos fueron los únicos grupos en los que dicha proteasa permanecía elevada a las 24 h ($p < 0,05$ *vs* 24 h MCAO), probablemente por ser los grupos que presentaron mayores hemorragias (**Figura 42A**).

Para confirmar estos datos se decidió realizar una zimografía de los sueros extraídos, determinando por densitometría la actividad dependiente de expresión de la pro-MMP-9 y de su forma activa. Los datos obtenidos fueron muy similares a los de concentración del ELISA (**Figura 42B**), observándose de nuevo la elevación transitoria sobre las 3h en los grupos tratados antes de ese tiempo con t-PA y los niveles considerablemente mayores a las 24 h en los grupos con TH (tPA 3h). Quizá, la

diferencia más importante es que el grupo tPA 20min control no presentó inducción de la actividad MMP-9 respecto al MCAO.

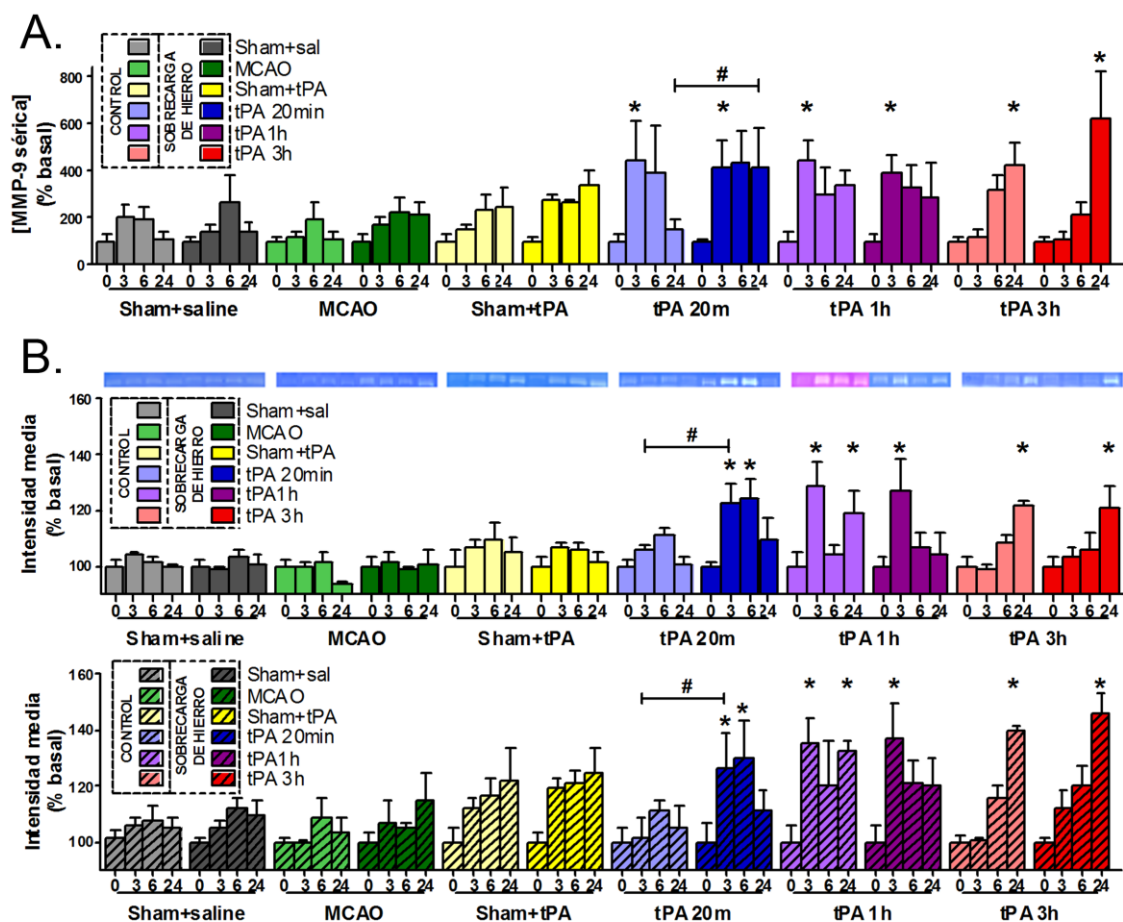


Figura 42. MMP-9 como marcador de TH. A. Concentración sérica en los diferentes grupos experimentales, **B.** Densitometría de las zimografías (geles en azul) de la pro-forma y de la forma activa de la MMP-9. Datos representados como media \pm SEM, * $p < 0,05$ *vs* MCAO, # $p < 0,05$ *vs* control.

Estos datos sugieren que hay dos picos de elevación de MMP-9, uno en el momento de la reperusión y/o administración de t-PA, que sería responsable de las elevaciones transitorias observadas a 3 h y, otro, en el caso de producirse lesión de consideración en la BHE, que aparecería más allá de las 24 h.

A grayscale microscopic image of neurons, showing several cell bodies (soma) with branching dendrites and axons. The neurons are distributed across the frame, with one prominent neuron in the upper center and others scattered below and to the left.

DISCUSIÓN

1. DESARROLLO DE UN MODELO DE TH

Debido a la creciente necesidad de estudiar el ictus con la metodología más adecuada posible, el grupo de Denis Vivien desarrolló en 2007 un nuevo modelo tromboembólico de isquemia (Orset et al., 2007), cuyas principales ventajas son que se asemeja bastante a la clínica y que la mortalidad es baja por presentar un infarto restringido al córtex. Sin embargo, la mayoría de los modelos de isquemia, incluido éste, fallan a la hora de reproducir un hecho que se produce de forma espontánea hasta en un 40% de los pacientes, la TH.

Este fenómeno es de vital importancia, puesto que restringe el uso del t-PA, el único fármaco aprobado para la fase aguda del ictus, al comprometer seriamente la vida del paciente. Así, la primera parte de la presente tesis doctoral consistió en la puesta a punto de un modelo de TH del ictus isquémico con el fin de posibilitar el estudio de los mecanismo que la producen. Para ello se empleó como base el modelo descrito por Orset y colaboradores.

1.1. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO

Al comenzar a trabajar con el modelo se observó que la concentración de trombina descrita originalmente, 0,75 UI/ μ l, no era suficiente para ocluir de forma estable la ACM, existiendo un alto porcentaje de reperfusiones espontáneas por autólisis. Para conseguir que el trombo permaneciera estable, al menos durante la hora en la que se registró el flujo sanguíneo cerebral, hubo que aumentar la concentración a 2 UI/ μ l. Si bien parte de los resultados podrían explicarse por la falta de experiencia previa con este modelo quirúrgico, el hecho de que otros trabajos (Campos et al., 2013; Ansar et al., 2014), incluso del mismo grupo que describió el modelo (Montagne et al., 2012), hayan confirmado los datos expuestos en la presente tesis doctoral requiriendo también concentraciones superiores a la original hace suponer que, bien hay diferencias notables entre las casas comerciales y/o lotes adquiridos de trombina, o bien la diferencia radica en las cepas animales empleadas.

En cualquier caso, con la concentración de 2 UI/ μ l se consigue un porcentaje de oclusiones estables del 83%, semejante a lo publicado en el trabajo original (Orset et al., 2007) y en otros posteriores (Durand et al., 2012; Montagne et al., 2012; Campos et al., 2013). Sin embargo, no puede descartarse que se hayan producido reperfusiones

espontáneas posteriores a la primera hora tras la inyección, que de hecho han sido descritas en este modelo (Durand et al., 2012), al no haberse continuado el registro de la perfusión cerebral más allá de este tiempo.

El tamaño de la lesión alcanzado es también semejante al descrito por Orset y colaboradores (Orset et al., 2007), ocupando exclusivamente el córtex. Además, se reduce el volumen de infarto cuando hay reperusión espontánea completa o parcial, hecho confirmado posteriormente por otros autores (Durand et al., 2012), otros modelos de isquemia y por numerosos artículos clínicos (para revisión ver (Molina and Alvarez-Sabin, 2009)), indicando que cuanto antes ocurre la reperusión menor es el tamaño de la lesión.

1.2. DESARROLLO DEL MODELO DE TH

Tras establecer la dosis de trombina necesaria para producir un coágulo estable se procedió a desarrollar el modelo de TH, para lo que se administró t-PA a las 3 h de la oclusión y se compararon los resultados obtenidos con los observados con la administración temprana (20 min) o con el tratamiento con vehículo (isquemia permanente).

En el caso del grupo tratado con salino (MCAO), la inyección de trombina anteriormente establecida produce un rápido descenso del flujo sanguíneo registrado, junto a un cambio de coloración del vaso. Según los criterios predefinidos, el coágulo es estable al menos durante los 60 primeros minutos tras la inyección de trombina y conduce a la aparición de un área infartada, restringida al córtex irrigado por la ACM, junto a unos síntomas neurológicos asociados, observados a las 24 h. Este grupo MCAO, tratado con vehículo, experimenta sangrados menores o microsangrados en un 46%, que en el restante 54% son de mayor importancia (HI-2 o PH-1). En la descripción original del modelo (Orset et al., 2007) se afirma que no se encuentran hemorragias visibles en ninguno de los animales, ni tratados con vehículo ni con t-PA a los 20 min. Sin embargo, tanto la medida del área hemorrágica como del volumen de sangre extravasado por espectrofotometría realizados en el presente trabajo muestran unos valores mínimos, probando que, aunque estos sangrados existen, son de poca importancia. Así, los valores de hemorragia encontrados estarían básicamente de acuerdo con lo anteriormente publicado.

Además, dos hechos pueden explicar esta aparente discrepancia. El primero es la técnica empleada para la observación histológica de la hemorragia. Mientras en la presente tesis doctoral se ha usado una simple tinción para eritrocitos, al ser estos ricos en peroxidasas endógenas (Wakisaka et al., 2010), Orset y colaboradores trabajaron con la tinción de Perl, con azul de Prusia, que sólo tiñe las hemorragias cuando éstas han empezado a ser reabsorbidas al reaccionar con la hemosiderina, producto que aparece en tejido al degradarse la hemoglobina o la ferritina (por lo que esta técnica ha sido empleada para detectar tanto hemorragias antiguas como hemocromatosis). Por lo tanto, podría ocurrir que la técnica empleada por Orset y colaboradores no permitiera observar las pequeñas hemorragias descritas en el presente trabajo.

El segundo hecho que puede explicar la discrepancia sobre las hemorragias es una diferencia en las reperfusiones a las 24 h. Orset y colaboradores describen que el coágulo producido tras la inyección de trombina es estable, al menos a las 24 h, ya que lo detectan aún a ese tiempo mediante estudios histológicos de la propia ACM, concluyendo así que no hay ni reperfusión ni sangrado. En el presente estudio el 85% de los animales considerados en el grupo MCAO, tratado con salino y teóricamente permanentemente ocluido, presenta una recanalización arterial a las 24 h, incluso pese a haber aumentado la concentración de trombina empleada, hecho que explicaría la aparición de sangrados. El presente trabajo ha sido el primero en describir dicha reperfusión espontánea tardía, la cual ha sido replicada experimentalmente y analizada con detalle empleando el mismo modelo quirúrgico y con porcentajes de reperfusión muy similares a los aquí detallados por Durand y colaboradores (Durand et al., 2012). Además, estos datos reproducen un hecho observado en los pacientes, que es que hasta un 25% acaban recanalizados espontáneamente a las 24 h (Rha and Saver, 2007), hecho que da al modelo un valor añadido en cuanto a la traslación de la investigación básica a la clínica.

La reperfusión temprana tras el tratamiento con t-PA a los 20 min de la oclusión induce una recuperación del flujo sanguíneo cerebral así como una recuperación del color arterial al menos unos 10 minutos después de haber iniciado la infusión del trombolítico. De acuerdo a lo publicado por Orset y colaboradores (Orset et al., 2007), esta recanalización precoz reduce el volumen de infarto y los déficits neurológicos observados a las 24 h en comparación con el grupo tratado con salino (MCAO). El hecho de que la reperfusión temprana mejore el pronóstico tras un ictus ha sido ampliamente demostrado y constituye la base del tratamiento trombolítico a los

pacientes (NINDS, 1995; Hacke et al., 2004). Además, y también en comparación con el grupo MCAO, esta reducción de la lesión es concomitante con una disminución en los parámetros de la hemorragia medidos, observándose sangrados inexistentes o de muy pequeño tamaño en un 90% de los casos (10% No hemorrágico, 80% HI-1), y moderados en sólo un 10% (HI-2). Estos datos indican que la recanalización temprana es capaz de rescatar parte del tejido comprometido aún cuando se asocia a la aparición de hemorragias de pequeño tamaño o petequiales (Molina et al., 2002), vinculándose los sangrados parenquimales al mayor tamaño de infarto, igual que ocurre en la clínica (Paciaroni et al., 2008; Terruso et al., 2009).

Sin embargo, la administración de t-PA a las 3 h de la oclusión produce resultados antagónicos a los de la recanalización temprana. Pese a que también consigue recuperar la perfusión cerebral, ni el tamaño del infarto ni los síntomas neurológicos observados a las 24 h se reducen en comparación con el grupo MCAO, con lo que el tratamiento tardío es incapaz de frenar la progresión del infarto, igual que ya había sido probado en la clínica (Hacke et al., 1995; Hacke et al., 1998; Clark et al., 1999). Más interesante resulta el hecho de que esta fibrinólisis tardía agrava las hemorragias, aumentando hasta el 75% los sangrados más extensos (37,5% HI-2, 37,5% PH-1), hecho de nuevo constatado en la literatura clínica (Larrue et al., 1997; Fiorelli et al., 1999; Larrue et al., 2001). Además, tanto el edema cerebral como el área hemorrágica y la cantidad de sangre extravasada aumentan significativamente en el grupo t-PA 3h, indicando que la administración tardía del fibrinolítico se asocia a un deterioro de la BHE que desencadena la TH (para revisión ver (Yang and Rosenberg, 2011)).

Ahora bien, ¿qué es lo que produce la TH, el t-PA o la propia reperusión? En un principio se pensaba que era el t-PA administrado el que inducía mayoritariamente las hemorragias a través de diversos mecanismos (aumento de MMP 2, 3 y 9; para revisión ver (Wang et al., 2004)), pero la verdad es que reperusión y t-PA resultaban inseparables. Hoy en día existen evidencias básicas (Copin and Gasche, 2008; Lu et al., 2009) y clínicas (Ciccone et al., 2013; Dorado et al., 2013) que apoyan que la reperusión tardía, por sí sola, es suficiente para producir sangrados. Por lo tanto, parece que el t-PA, tanto por inducir la revascularización como por sus efectos secundarios, estaría potenciando la TH. No obstante, la dosis de trombolítico empleada en este y otros trabajos experimentales semejantes (Dijkhuizen et al., 2001; Gautier et al., 2003; Zhang et al., 2005), es 10 veces superior a la usada en clínica y podría estar exacerbando este efecto secundario. El hecho de emplear esta dosis es porque el t-PA recombinante,

de origen humano, muestra una actividad 10 veces menor contra la fibrina de roedores que contra la humana, por lo que se aumenta la concentración para igualar la actividad fibrinolítica que se logra en la clínica. Sin embargo, no existen datos acerca de si el t-PA recombinante administrado en animales muestra más o menos efectos secundarios que los que desencadena en la clínica, como la apertura de la BHE, hecho que necesita ser estudiado en profundidad.

El presente trabajo reproduce otros dos hechos clínicos que pocas veces son relatados en los trabajos experimentales: la reperfusión espontánea y la no recanalización tras la administración de t-PA (Saqqur et al., 2008). Por un lado, tras la inyección de trombina, un 17% de animales sufren reperfusión espontánea por autólisis, observándose tanto una recuperación del color arterial como un restablecimiento de los valores basales de perfusión cerebral. En este caso, tanto el tamaño del infarto como de la hemorragia son semejantes a los encontrados en el grupo tPA 20min, confirmando el beneficio de la recanalización arterial temprana. Por otro lado, aproximadamente un 45% de los animales tratados con t-PA muestran resistencia a la fibrinólisis y no reperfundan tras el tratamiento, igual que se ha observado en la clínica (para revisión ver (Rha and Saver, 2007)). En dicho grupo el volumen de infarto es máximo, semejante a los animales no tratados (grupo MCAO) o reperfundidos de forma tardía (tPA 3h), mientras que los valores de sangrado son intermedios entre ambos grupos. De nuevo, el hecho de que ambos sean fenómenos que se dan en los pacientes dan al modelo un valor traslacional sumamente importante.

Cabe destacar una importante discrepancia entre el presente trabajo y las evidencias clínicas: la ventana terapéutica del t-PA es más corta en el caso de los modelos animales, mientras que en el humano aún resulta beneficiosa más allá de las 3 h. Algunas de las razones que podrían argumentarse para explicar estas diferencias son que, en clínica, la eficacia de la recanalización se ha evaluado según los síntomas manifestados a los 3 meses del tratamiento mientras que en básica se mide la reducción del volumen de infarto a 24-48 h; que los ictus rara vez ocasionan una depleción total del riego sanguíneo en clínica, sino más bien una reducción por estenosis, mientras en básica la reducción es total por lo que la progresión puede ser más rápida; o, lo más probable, que el metabolismo acelerado de los roedores conllevaría una mayor susceptibilidad isquémica y un acortamiento de la ventana de beneficio de la reperfusión. Respecto al primer hecho, se ha demostrado que pese a que un tratamiento no disminuya los síntomas durante los primeros días, y presumiblemente tampoco el

tamaño del infarto, sí puede provocar que la evolución sea mejor, apareciendo diferencias significativas al mes del episodio isquémico (Wang et al., 2014). Así, la evaluación de eficacia de la terapia trombolítica al mes de sufrir el ictus podría estar desvelando una mejor evolución de los pacientes que desde la básica, analizando a 24-48 h, no se es capaz de observar.

Pese a esta aparente discrepancia en la ventana terapéutica, el modelo quirúrgico descrito presenta grandes ventajas como su alta reproducibilidad, la baja mortalidad y, sobre todo, su gran semejanza con la clínica al replicar los beneficios de la recanalización temprana, la TH tras la revascularización tardía, las reperfusiones espontáneas y la resistencia a la fibrinólisis. Todos estos hechos son muy importantes a la hora de elegir un modelo de isquemia cerebral y convierten al modelo TIS en uno de los más adecuados para el estudio del ictus, sino el que más. Probablemente destaca su enorme semejanza a la clínica en cuanto a la oclusión y reperfusión del vaso, ajustándose a los criterios recomendados por la comisión STAIR. La no reperfusión tras la terapia trombolítica y la reperfusión espontánea, temprana o tardía, son hechos que ocurren muy frecuentemente en la clínica, pero que no son reproducidos por otros modelos de isquemia cerebral. Este modelo resulta único al ser capaz de replicar ambos hechos, lo que lo convierte en el modelo a emplear para estudios de la terapia trombolítica y de sus efectos secundarios como la TH. Además, como ha sido desarrollado en ratón, posibilita el uso de animales genéticamente modificados, muy útiles para investigar los mecanismos patofisiológicos.

Sin embargo, el modelo presenta algunas limitaciones que han de ser tenidas en cuenta: 1) Requiere de una cirugía importante, incluida craniectomía e inyección arterial, que podrían estar produciendo sangrados extraparenquimales, pese a que éstos son fácilmente identificables y excluibles; 2) No puede descartarse que la trombina inyectada esté produciendo efectos secundarios como daño a la BHE y edema (Lee et al., 1997; Liu et al., 2010) o apoptosis (Donovan et al., 1997; Xi et al., 2003), pese a que la dosis inyectada es mínima y presenta una corta semivida; 3) El coágulo formado es rico en fibrina, asemejándose más a los ictus cardioembólicos que a los aterotrombóticos y pudiendo ser más propenso a la reperfusión por t-PA (Niessen et al., 2003); 4) las diferencias de las ventanas terapéuticas ya debatidas.

1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA TH

Con el fin de explorar el estado de la BHE tras realizar el modelo de isquemia descrito se examinaron en cerebro algunas de las moléculas que la constituyen, como proteínas de las TJs o de la lámina basal, así como otras que han sido implicadas en su degradación, como las MMPs. Sabiendo previamente que mientras la fibrinólisis a los 20 min tras la isquemia resulta protectora y que a 3 h provoca daño a la BHE, se decidió administrar el t-PA a un tiempo intermedio, 2 h, para tratar de observar cuándo comenzaba a producirse el cambio de efecto beneficioso a perjudicial. En este caso, el tejido se analizó 48 h post-isquemia.

El primer dato que resulta interesante es que el tratamiento con t-PA a 2 h de la isquemia no es eficaz a la hora de reducir ni el volumen de infarto, ni los déficits neurológicos observados (en esta ocasión con más de un test). Pese a lo llamativo de este resultado en comparación con la clínica, en donde se ha observado una ventana superior a 4,5 h, las mismas razones argumentadas en el apartado anterior han de ser tenidas en cuenta: que la eficacia en clínica se evalúa a los 3 meses según los síntomas manifestados, que los ictus en pacientes suelen ocurrir por una estenosis más que por una depleción total del riego sanguíneo y, más probablemente, que el metabolismo acelerado de los ratones podrían conllevar una mayor susceptibilidad a la isquemia.

Además, el tratamiento a 2 h no sólo no es eficaz, sino que conlleva la aparición de TH, como indican las mayores hemorragias encontradas en el grupo tratado respecto al vehículo. Resulta curioso que ya a un tiempo tan temprano la administración de t-PA pueda estar fomentando la TH pero, de nuevo, dos hechos que pueden estar potenciando este fenómeno son el posible efecto vascular de la trombina inyectada para inducir la isquemia y que la dosis de t-PA es 10 veces mayor que la que se administra en clínica y, por lo tanto, se pueden potenciar sus efectos colaterales. Además, las hemorragias encontradas son semejantes a las que se producen con la administración de t-PA a 3 h aunque, en este caso, se analizaron a las 48 h de isquemia en vez de a las 24 h. Esta diferencia de tiempo resulta fundamental puesto que la literatura acepta que la TH asociada a la terapia trombolítica se produce en las primeras 6-24 h tras el tratamiento, apareciendo posteriormente otras hemorragias que pueden estar producidas por mecanismos muy diferentes como inflamación o angiogénesis (para revisión ver (Jickling et al., 2014)). Por lo tanto, debido a que se ha analizado más allá de las 24 h, no puede afirmarse que todas las hemorragias encontradas estén asociadas a

la terapia de reperfusión, aunque el hecho de que el tratamiento con t-PA potencie la TH queda claramente demostrado.

Al analizar la actividad gelatinasa en el tejido se observa que la isquemia produce una inducción notable principalmente en el *core* o región central del infarto. Pese a no realizar co-localizaciones para estudiar el tipo celular al que se asocia el marcaje, la tinción parece fundamentalmente neuronal, como así ha sido descrita por diferentes autores (Planas et al., 2001; Amantea et al., 2008; Liguz-Leczna et al., 2012). Además, como ya observaron Amantea y colaboradores, la actividad gelatinasa tras la isquemia tiene lugar fundamentalmente en el núcleo de las neuronas, aunque a las 24 h de la isquemia también aparece un claro marcaje citosólico que, según los presentes datos, sigue observándose a las 48h. En la región peri-infarto, sin embargo, se observa un marcaje con una morfología claramente endotelial, que también ha sido descrito (Amantea et al., 2008). La mayoría de los autores consideran que la actividad gelatinasa que se observa en el cerebro se debe a las MMP-2 y 9, aunque otras proteasas y cierta actividad inespecífica podrían contribuir.

Las MMPs son proteasas ampliamente estudiadas en el contexto del ictus debido a que han sido implicadas clásicamente en procesos como la hematopoyesis, disrupción de la BHE, modulación del sistema inmune, remodelación tisular, angiogénesis, plasticidad sináptica y migración celular. Entre ellas, especialmente las dos gelatinasas, MMP-2 y 9, y en los últimos años la MMP-3, son las que parecen desempeñar el papel más relevante en la apertura bifásica de la BHE que ocurre en isquemia. La MMP-2 es la que más abunda en el cerebro y, pese a que tradicionalmente se ha dicho que es constitutiva, varios estudios demuestran que su expresión (Heo et al., 1999; Yang et al., 2007) y sobre todo su actividad (Rosenberg et al., 1998; Planas et al., 2001; Chang et al., 2003), se induce en las primeras horas tras la isquemia, siendo responsable de una primera apertura temprana de la BHE. Destaca el estudio de Yang y colaboradores en el que, empleando el modelo intraluminal, observaron por PCR e inmunohistoquímica una inducción de MMP-2 sobre las 2-3 h de isquemia seguida de una activación, analizada mediante zimografía de tejido e *in situ*. Así, las células que sobreexpresan esta proteasa en respuesta a la isquemia parecen ser fundamentalmente las neuronas y, en menor grado, los pies astrocitarios (Yang et al., 2007) y las células endoteliales (Chang et al., 2003) donde ha sido implicada en los mecanismos de daño neuronal y apertura temprana de la BHE respectivamente. Todos los estudios anteriormente citados coinciden en señalar que esta inducción de la MMP-2 es transitoria y que sobre las 6 h

post-isquemia sus niveles son de nuevo normales, aunque persiste su activación por la isquemia. Así, la actividad gelatinasa a 24 h, localizada por zimografía *in situ* mayoritariamente en las neuronas (Amantea et al., 2008), se debería principalmente a la MMP-2 activada y no a la MMP-9 porque, además de ser mayoritaria en el cerebro, es la que se sobreexpresa en este tipo celular. Finalmente, también se ha descrito un aumento tardío de esta proteasa, asociado fundamentalmente a la infiltración más allá de los 2-4 días y a la inducción en la microglía (Planas et al., 2001).

No obstante, la MMP-9 puede contribuir a este marcaje de la actividad gelatinasa, especialmente al observado en el endotelio. Al contrario que la MMP-2, se encuentra fuertemente inducida y activada a las 24-48 h de la isquemia (Liguz-Leczna et al., 2012), con una localización preferente en las células endoteliales y células infiltradas. Así, su inducción y activación parece ser la responsable de una segunda apertura más tardía de la BHE, hecho que se discutirá posteriormente, junto a las determinaciones moleculares realizadas tras la administración de t-PA a las 3 h, que constituyen el grueso de la caracterización molecular de la TH.

El hecho de que la actividad gelatinasa se localice en el núcleo neuronal parece indicar que estas proteasas están siendo inducidas durante la isquemia por la activación de varios factores de transcripción que se unen a su promotor, como NF- κ B o AP-1. Así, tras su activación probablemente por estrés oxidativo (Gu et al., 2002), parece intervenir, en el caso de las neuronas, en la inducción de la muerte por anoikis al degradar la matriz que las rodea (Gu et al., 2005) o promoviendo la inflamación al procesar proteolíticamente la proforma de algunas citoquinas (Amantea et al., 2007). En el caso del endotelio, las MMPs se han asociado fuertemente con la disrupción de la BHE típica de isquemia (para revisión ver (Jickling et al., 2014)).

Además, los datos indican que el tratamiento con t-PA a las 2 h de isquemia, que se asocia a la aparición de TH, produce también una actividad gelatinasa incrementada, mostrada por una mayor intensidad de fluorescencia. Otros estudios han encontrado también que el t-PA induce la actividad gelatinasa, aunque en este caso a 16 h post-isquemia (Fan et al., 2013). Estos datos sugieren que el t-PA puede promover la expresión de alguna gelatinasa, presumiblemente MMP-9 (Wang et al., 2003; Suzuki et al., 2009), pudiendo potenciar así la TH. De hecho, se ha demostrado que la inhibición del sistema u-PA endógeno reduce tanto la expresión como la actividad de MMP-9 y la TH tras una isquemia cerebral (Tai et al., 2010).

2. LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Desde hace tiempo se sabe que el hierro puede jugar un papel deletéreo en la isquemia cerebral gracias a su capacidad para formar especies oxidantes. A partir de los años '90 numerosas evidencias clínicas (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Choi et al., 2011) y básicas (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004) revelaron que los niveles altos de este elemento se asociaban a mal pronóstico tras un ictus e incluso a mayor TH tras la terapia trombolítica (Millan et al., 2007; Millan et al., 2008). Sin embargo, estas evidencias fueron puestas en duda ya que los niveles de hierro se midieron como niveles de ferritina sérica al ingreso, es decir, una vez comenzado el evento isquémico, por la imposibilidad de realizar tomas a los pacientes antes del ictus. Si dicha proteína aumenta a tiempos cortos tras la isquemia no sería un marcador fiable de los depósitos de hierro, sino que sería un marcador de fase aguda e indicaría más bien gravedad del ictus. Así pues, la segunda parte de la presente tesis doctoral consistió en estudiar la cinética de la ferritina sérica tras la isquemia y el papel del hierro en la isquemia cerebral, más concretamente, en la TH asociada a la terapia trombolítica, empleando para ello el modelo desarrollado anteriormente.

2.1. CINÉTICA DE LA FERRITINA SÉRICA

La ferritina sérica es una proteína que ha sido ampliamente empleada en medicina como un marcador fiable de los depósitos de hierro en el organismo debido a que es liberada al torrente sanguíneo por el hígado según los niveles de dicho elemento. Así, tradicionalmente se ha determinado su concentración para el diagnóstico de la hemocromatosis, enfermedad que cursa con un aumento de los depósitos sistémicos de hierro. Los datos aquí presentados muestran, tal y como era de esperar, que la ferritina sérica está elevada en los animales con sobrecarga oral de hierro, por lo que constituye un modelo de hemocromatosis, como así lo reconoce la literatura (Nielsen et al., 1993).

Sin embargo, la ferritina sérica también es una proteína de fase aguda, por lo que es sintetizada y liberada por el hígado en respuesta a determinados estímulos (Beard et al., 2006). Entonces, ¿podría ocurrir que se indujera tras un ictus? Las determinaciones realizadas a 0, 3 y 24 h tras la isquemia, empleando varios modelos permanentes y transitorios y tanto en animales con niveles normales como con sobrecarga de hierro, muestran que la ferritina sérica permanece estable respecto a su basal al menos durante las primeras 24 h tras un daño isquémico moderado. Las únicas diferencias encontradas

corresponden a los niveles elevados en los animales con sobrecarga oral de hierro, pero sin cambio tras la isquemia respecto a la basal. Estos resultados, que constituyen el estudio más exhaustivo al respecto hasta la fecha, se ven apoyados por varias publicaciones clínicas (Armengou et al., 1998; Millan et al., 2007; Chakraborty et al., 2012; Ozkan et al., 2013), en donde se demostró que la ferritina sérica no se alteraba durante los 2 primeros días tras un ictus ni hasta 6 meses. Además, un estudio experimental mostró, usando también diferentes modelos de isquemia (fototrombosis y oclusión de los 4 vasos) que la isquemia moderada no alteraba los niveles de ferritina sérica en las primeras 24 h (Millerot et al., 2005). Sin embargo, Millerot y colaboradores, empleando un tercer modelo de isquemia por embolización, también hallaron que cuando el daño isquémico es grave (lesiones sobre el 60-90% de hemisferio) sí puede inducirse la ferritina sérica (Millerot et al., 2005). De hecho, analizando detalladamente algunos estudios clínicos que asociaban mayores niveles de hierro a un peor pronóstico tras un ictus, puede observarse que los grupos con los niveles elevados presentaban etiologías que producían un infarto más grande y una mayor respuesta inflamatoria medida por la proteína C-reactiva o la IL-6 (Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Millan et al., 2007; Perez de la Ossa et al., 2010; Choi et al., 2011). Estos resultados podrían sugerir que el mayor infarto produce una inducción de la ferritina sérica, la cual dejaría entonces de ser un marcador fiable de los depósitos de hierro.

Dos hechos más merecen ser considerados. El primero es que los resultados de Millerot y colaboradores muestran una inducción sólo a 24 h, no a tiempos más tempranos, por lo que parece bastante claro que las medidas de ferritina sérica en admisión, independientemente del tamaño del infarto, no estarían elevadas por la isquemia e indicarían los niveles de hierro en el organismo. El segundo es que sólo se eleva cuando el infarto es muy grande, situación en la que podría ocurrir que la ferritina del tejido cerebral se libere por la muerte celular y llegue al torrente sanguíneo mezclándose con la ferritina sérica.

Por lo tanto, pese a que no se puede excluir que la ferritina sérica se eleve tras un daño isquémico de consideración, parece claro que, incluso tras un ictus, esta proteína continúa siendo un marcador fiable de los depósitos de hierro en el organismo. Así, las evidencias clínicas apoyarían el posible papel deletéreo del hierro en la isquemia cerebral.

2.2. PAPEL DEL HIERRO EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Como ya se ha explicado, todo un conjunto de evidencias habían puesto de manifiesto que los niveles alto de hierro se asociaban a mal pronóstico tras un ictus. Sin embargo, otros autores habían sido incapaces de mostrar dicho efecto (Christensen et al., 2002; Millerot et al., 2005), por lo que el papel del hierro en la isquemia cerebral quedaba sin resolver. Para estudiar este punto se sometió a diferentes modelos de isquemia, modelo TIS permanente y ligadura distal permanente y por 1 y 3 h, a animales tanto con sobrecarga como con niveles estándares de hierro.

Los datos muestran que los niveles elevados de hierro sólo provocan un mayor volumen de infarto cuando la isquemia es seguida de una reperusión temprana. Cuando no hay reperusión (empleando dos modelos diferentes) o ésta es muy tardía el volumen de infarto no se altera respecto a los animales con niveles normales de hierro. Estos datos sugieren que el hierro podría estar jugando un importante papel en la evolución de la penumbra isquémica acelerando la muerte celular y empeorando así el pronóstico tras un ictus.

La diferencia fundamental entre los modelos empleados es el estado de la zona afectada en el momento de la reperusión, puesto que la evolución de la penumbra es muy rápida y desemboca en la muerte del tejido. Así, en la isquemia permanente, la penumbra evolucionará irremediablemente y sufrirá muerte celular; en la reperusión tardía a las 3 h de la isquemia, la mayoría de la penumbra ya está infartada o muy afectada cuando la recanalización tiene lugar y, en la reperusión temprana, gran parte de esta área será rescatada produciendo sólo un pequeño infarto, como así ha sido demostrado con técnicas de imagen (Sobrado et al., 2011). Además, estos resultados se apoyan en la literatura porque los trabajos que no habían encontrado efecto alguno del hierro empleaban un modelo permanente, la fototrombosis (Millerot et al., 2005), mientras que los que describían el efecto deletéreo emplearon modelos transitorios con reperusión temprana (filamento intraluminal (Mehta et al., 2004)).

Presumiblemente, el hierro contribuye al estrés oxidativo, el cual desempeña un papel central en la muerte celular durante la isquemia. De hecho, el exceso de este elemento en su forma ferrosa resulta tóxico debido a que cataliza la reacción de Fenton, generando radicales hidroxilo, poderosos oxidantes que producen estrés oxidativo y daño celular (para revisión ver (Fraser, 2011)). Estos datos podrían explicar el efecto neuroprotector de algunos agentes quelantes de hierro que disminuyen la formación de

ROS y el daño isquémico (Patt et al., 1990; Jacobsen et al., 1992; Rosenthal et al., 1992; Soloniuk et al., 1992; Yamamoto et al., 1997; van der Worp et al., 1999; Demougeot et al., 2004). Además, la formación de radicales hidroxilo por el hierro libre podría desempeñar un papel adicional en la disrupción de la BHE, como muestran la mayor área hemorrágica y el mayor edema cerebral encontrados en los animales con sobrecarga de hierro. Aunque el modelo de ligadura empleado no sea el más adecuado para estos estudios, los datos estarían en la línea de algunos hallazgos clínicos (Millan et al., 2007; Millan et al., 2008; Choi et al., 2011) que han asociado unos mayores niveles de hierro a una mayor probabilidad de TH tras la terapia trombolítica.

Existen datos clínicos previos (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012) en los que a pesar de encontrar esta relación entre mayor daño isquémico y mayores niveles de hierro en los pacientes, éstos no habían recibido terapia de reperusión alguna, por lo que debe asumirse que se trataban de casos de isquemia permanente o reperusión tardía, grupos en los que los presentes datos experimentales no han replicado dicha asociación. La principal diferencia es que los datos experimentales analizan el volumen de infarto a las 24 h mientras que en los estudios clínicos el análisis se realizó entre 2-5 días después del ictus. Esta diferencia en el protocolo puede ser clave, puesto que la sobrecarga de hierro podría estar ejerciendo un daño secundario a la isquemia que contribuiría a extender la zona infartada después de las 24 h. De hecho, se ha demostrado que la sobrecarga de hierro no se asocia a daño extra en las primeras 24 h tras un ictus hemorrágico, pero que a los 3-4 días provoca un mayor edema (Mehdiratta et al., 2008). Además, los estudios experimentales que han encontrado que el hierro agrava el daño isquémico estudiaron el volumen del infarto a las 48 h (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004). Finalmente, la localización de la lesión puede ser otro factor a tener en cuenta para explicar esta divergencia, siendo exclusivamente cortical en el presente trabajo, mientras que es de afectación estriatal en el resto de estudios básicos y de muy diversa etiología en los clínicos.

2.3. PAPEL DEL HIERRO EN LA TH

Los resultados obtenidos con el modelo de la ligadura mostraban unos volúmenes de infarto que dependían en gran medida del estado del tejido en el momento de la reperusión, en definitiva, de si seguía habiendo tejido susceptible de ser salvado. Si ésta

no existe o es demasiado tardía, el volumen de infarto es máximo e independiente de los niveles de hierro, puesto que los mecanismos ya desencadenados llevan a la muerte del tejido hipoperfundido. Sólo cuando se da una reperfusión temprana tras la isquemia, que rescata parte del tejido comprometido, se observa un mayor infarto en el grupo con niveles altos de hierro, lo que invita a pensar que este elemento podría intervenir en la muerte celular y acelerar la progresión de penumbra a *core*.

Además, pese a no ser el modelo ideal para estudiar el fenómeno de la TH, los datos de edema y área hemorrágica parecen indicar que, cuando los niveles sistémicos de hierro están elevados, el tejido no sólo es más susceptible a morir tras la isquemia, sino que también puede sufrir un daño a la BHE exacerbado. Para corroborarlo se empleó el modelo TIS, administrando t-PA a diferentes tiempos tras la oclusión (20 min, 1 y 3 h) en animales con y sin sobrecarga oral de hierro, para analizar así la evolución en las primeras 24 h, tanto del área afectada como de posibles marcadores séricos.

En primer lugar, este conjunto de experimentos confirma que el modelo TIS reproduce varios hechos clínicos. El primero de ellos es la reperfusión espontánea por autólisis, que se observa esta vez en sólo un 2% de los animales con dieta estándar. La diferencia, respecto al 17% de reperfusión espontánea observado durante la puesta a punto del modelo de TH es que, en este caso, la trombina se inyectó más lentamente precisamente para evitar la exclusión por este motivo. El segundo hecho replicado es la no reperfusión tras la terapia trombolítica en un 45% de los animales, semejante a lo anteriormente descrito durante el establecimiento del modelo. En el caso de los animales con sobrecarga de hierro, los datos muestran que recanalizan mejor, ya que se dan más casos de reperfusión espontánea por autólisis tras la inyección de trombina (8%) y menos de no reperfusión tras la administración de t-PA en cualquiera de sus tiempos (20 min, 1 y 3 h, 12% de no reperfusión global). Además, esta mayor facilidad para reperfundir también queda apoyada por el hecho de que al analizar el tiempo promedio en el que se produce la recanalización arterial (flujo superior al 50% del basal) se observó, de nuevo en todos los tiempos de tratamiento con t-PA, que los animales con sobrecarga de hierro reperfundían antes que los controles, unos 35 min de promedio. Así, queda claramente demostrado que la sobrecarga de hierro induce una recanalización más exitosa y anterior en el tiempo que en el caso de la situación control, hecho absolutamente novedoso en la literatura.

Apenas existen estudios que arrojen luz sobre los mecanismos por los que el hierro puede estar interfiriendo en la coagulación/trombolisis, y los que hay son bastante

recientes y proponen diferentes modos de acción. El hecho que parece más confirmado es que la deficiencia de hierro, generalmente producida por la anemia que caracteriza a enfermedades que transcurren con hemorragias crónicas, origina una predisposición a la agregación plaquetaria sin que se alteren el resto de los parámetros de la coagulación. Así, los pacientes con dicha carencia serían más propensos a sufrir un ictus que aquellos con niveles normales de hierro, al menos en algunas patologías (Shovlin et al., 2014). El mecanismo exacto permanece sin aclarar, aunque se ha propuesto que las plaquetas son más reactivas (Shovlin et al., 2014) cuando hay deficiencia de hierro o que ésta ocasiona una trombocitosis en sangre (Evstatiev et al., 2014). En cualquier caso, parece lógico que existan mecanismos que promuevan la coagulación sanguínea cuando hay deficiencia de hierro ya que así se favorecería frenar las hemorragias que están produciendo la anemia. Otros mecanismos propuestos por los que el hierro podría participar en la coagulación, siempre inhibiéndola, son que favorece la resolución del coágulo por parte de los macrófagos, promoviendo la fibrinólisis y restaurando la circulación (Saha et al., 2013) o que interacciona con proteínas de la coagulación y debilita la red de fibrina de los coágulos (Jankun et al., 2014). Sea como fuere, los resultados aquí presentados muestran de manera contundente que la sobrecarga de hierro favorece la reperusión, tanto espontánea como inducida por la administración de t-PA, probablemente por alguno de los mecanismos anteriormente propuestos.

El segundo hecho constatado por este conjunto de experimentos es que la recanalización temprana disminuye el volumen de infarto, siendo más notable la mejoría cuanto antes se administre la terapia trombolítica. Así, en los animales con niveles estándares de hierro, el tratamiento con t-PA a los 20 min rescata una mayor proporción del tejido comprometido por la isquemia que el tratamiento a 1 h, aunque ambos resultaron beneficiosos. Además, los resultados también confirman que el tratamiento a 3 h no reduce el tamaño de la lesión y, en definitiva, que esta terapia tan tardía no produce beneficio alguno. En total, en los diferentes experimentos realizados, se observa que el tiempo más tardío de administración de t-PA que aún logra reducir el tamaño de la lesión es de 1 h post-isquemia, fracasando en este aspecto la terapia de reperusión a 2 y 3 h.

En cuanto a los animales con sobrecarga oral de hierro, de nuevo se pone de manifiesto que la reperusión temprana resulta beneficiosa, rescatando parte del tejido comprometido y disminuyendo el volumen del infarto. En este caso, sólo la fibrinólisis a los 20 min resulta eficaz, fracasando la terapia a 1 y 3 h a la hora de disminuir el tamaño

de la lesión. Cabe destacar, como ya se ha señalado anteriormente, que en este grupo experimental la reperusión tras la administración de t-PA se produce antes en el tiempo, por lo que el tiempo de isquemia real es menor que en los animales con niveles normales de hierro y, pese a ello, el volumen de infarto es mayor que en los animales controles tanto reperfundiendo a 20 min como a 1 h. Estos resultados apoyan fuertemente los obtenidos con el modelo de ligadura y, en su conjunto, constituyen el trabajo experimental más exhaustivo realizado hasta la fecha sobre el efecto de la sobrecarga de hierro en el ictus. La conclusión extraída de los datos presentados es que dicha sobrecarga acelera la muerte en el tejido comprometido, favoreciendo la evolución a *core* y disminuyendo la ventana de tiempo en la que el t-PA resulta beneficioso. Las evidencias bibliográficas a favor y en contra de este posible papel del hierro ya han sido discutidas con anterioridad, existiendo numerosos trabajos clínicos a favor (Davalos et al., 1994; Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Chakraborty et al., 2012) y alguno experimental algo más controvertido (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004).

Otros datos importantes obtenidos con este modelo son los referidos a los sangrados, por tratarse de un modelo desarrollado específicamente para estudiar la TH. En este caso, se observa que apenas aparecen sangrados de consideración en los animales permanentemente ocluidos, independientemente de sus niveles de hierro, presentándose en un 30-40% de los animales hemorragias de tamaño medio (IH-II y PH). El tratamiento con t-PA a los 20 min, además de disminuir el volumen del infarto en ambos grupos control y con sobrecarga de hierro, disminuye la frecuencia de estos tipos de sangrados hasta un 14%, aunque ni el tamaño de las hemorragias ni el edema varían significativamente. Por otro lado, la fibrinólisis 1 h post-isquemia, que reduce la lesión sólo en los animales con niveles estándares de hierro, provoca hemorragias semejantes a las de los grupos MCAO pero, si hay sobrecarga de hierro, los sangrados más graves (tipos IH-II y PH) aparecen más frecuentemente, hasta un 67%. Este dato se confirma porque los valores de edema y volumen de hemorragia son significativamente mayores cuando los niveles de hierro son altos. Finalmente, la reperusión tardía a 3 h post-isquemia aumenta de forma clara la importancia de las hemorragias en ambos grupos control y con sobrecarga (70-85% de IH-II y PH), lo que indica que presentan un deterioro de la BHE considerable que induce a la aparición del fenómeno de TH, hecho apoyado por un mayor edema, mayor área hemorrágica y mayor extravasación de IgG de estos grupos experimentales.

La interpretación de estos datos es que el deterioro de la BHE transcurre progresivamente y de forma simultánea a la muerte del tejido tras la isquemia. Así, la terapia de reperfusión con t-PA resulta efectiva sólo cuando aún hay tejido susceptible de ser rescatado (20 min y 1 h en animales controles, 20 min con niveles altos de hierro). De lo contrario, la fibrinólisis no sólo pierde sus efectos beneficiosos, sino que puede estar potenciando mecanismos que dañan la BHE, tanto por el t-PA como por la reperfusión *per se*, induciendo la aparición del fenómeno de la TH (3h en controles, 1 y 3 h con sobrecarga de hierro). Hasta la fecha pocos son los trabajos que estudian el papel del hierro en la TH, existiendo exclusivamente dos publicaciones clínicas en las que se demuestra que los mayores niveles de hierro, medidos por la concentración sérica de ferritina, se asocian a una mayor probabilidad de TH tras la administración de t-PA (Millan et al., 2007; Choi et al., 2011). Por lo tanto, este trabajo constituye la primera evidencia experimental de que la sobrecarga de hierro favorece la TH tras la fibrinólisis. Además, las connotaciones de este conjunto de evidencias son claras, puesto que si pacientes con sobrecarga de hierro son tratados con t-PA, no sólo tendrían menos beneficios de esta terapia, puesto que la muerte tisular ocurre de manera anticipada, sino que, además, van a sufrir con mayor probabilidad el temido fenómeno de la TH. Por lo tanto, en este grupo de pacientes la ventana terapéutica puede estar reducida y su exclusión de la trombolisis ha de ser considerada. Así, estos datos indican que deben revisarse los criterios de inclusión en las terapias de recanalización, hecho que tendría unas profundas e importantísimas repercusiones clínicas que pueden ayudar a hacer más seguras y a maximizar el beneficio obtenido de dichas terapias.

Pese a la contundencia de los resultados y de la bibliografía demostrando que la sobrecarga de hierro aumenta el daño isquémico, los mecanismos precisos por los cuales actúa no están bien dilucidados. Es bien conocido que el tejido isquémico, como consecuencia del metabolismo anaerobio, desarrolla una acidosis local que induce el cambio conformacional de numerosas proteínas. Entre ellas lo sufren la ferritina y la transferrina, principales proteínas de unión del hierro, por lo que se libera Fe^{2+} que, en su forma más reactiva, contribuye al daño celular mediante la producción de ROS (para revisión ver (Selim and Ratan, 2004)). Este aumento del hierro libre ocurre muy temprano tras la isquemia (1 h) y afecta tanto al tejido isquémico como al periférico, que también está hipoperfundido, aunque es transitorio y se reestablecen rápidamente los niveles normales (Millerot-Serruot et al., 2008). Este mecanismo explica la

implicación del hierro en la cascada isquémica y por lo tanto, ante niveles altos de hierro, las vías lesivas se encontrarían exacerbadas.

Sin embargo, resulta especialmente curioso que enfermedades como la hemocromatosis, que cursan con niveles de hierro anormalmente altos en la mayoría de los órganos, no desarrollen acúmulos en el cerebro (Eaton and Qian, 2002; Nandar and Connor, 2011). Parece que el principal encargado de esta homeostasis es el endotelio al ser capaz de secuestrar e inactivar el hierro libre y de controlar su paso al parénquima (Deane et al., 2004). De hecho, en la hemocromatosis, pese a que los niveles globales en el cerebro son normales, sí parecen observarse acúmulos menores en los órganos circunventriculares (Cammermyer, 1947), que carecen de BHE. Por lo tanto, ¿cómo puede la sobrecarga de hierro exacerbar el daño isquémico si los niveles cerebrales de este elemento permanecen inalterados? La manera más probable de que esto ocurra es mediante la entrada de más hierro al cerebro cuando la BHE está alterada. Esto ha sido demostrado por Millerot-Serurot y colaboradores, mostrando que rápidamente tras la isquemia se produce un aumento en los niveles totales de hierro en el área infartada y que éste, al encontrarse libre, reacciona generando especies oxidantes que contribuyen al daño tisular (Palmer et al., 1999; Millerot-Serrurot et al., 2008). Este aumento del hierro total no es transitorio, puesto que permanece elevado hasta meses tras el infarto debido a que células fagocíticas, como la microglía residente, lo fagocitan y acumulan (Kondo et al., 1995).

Parece claro que la fuente de este hierro que entra al cerebro tras la isquemia debería ser la sangre. Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto, la apertura de la BHE que se produce como consecuencia del daño tisular podría facilitar el paso al parénquima cerebral de proteínas que unen hierro, como la Tf o la ferritina sérica o más tardíamente de células inmunes ricas en este elemento e incluso, si hay TH, de eritrocitos. De hecho, parece que tras la isquemia se producen depósitos de hierro de localización preferentemente perivascular (Mehta et al., 2004) o endotelial (Won et al., 2011), que contribuirían al daño a la unidad neurovascular no sólo en las primeras horas tras la isquemia, sino incluso durante días o semanas (Bishop and Robinson, 2001). Así, en los animales con sobrecarga entraría mucho más hierro ya que se encuentra aumentado en sangre, lo que provocaría un daño cerebral exacerbado en este grupo experimental, aumentando la muerte celular y el daño a la BHE. Sería necesario determinar los niveles cerebrales de hierro tras la isquemia para confirmar este punto.

Por problemas metodológicos, tampoco se ha podido determinar un mayor estrés oxidativo en el tejido isquémico, aunque otros autores sí han mostrado que la sobrecarga de hierro exacerba la producción de especies oxidantes tan pronto como 30 min tras la isquemia, aunque no antes de ella (Mehta et al., 2004). En su lugar se recurrió a la determinación sérica de MDA, un producto de la peroxidación lipídica. Los resultados muestran que sus niveles no se alteran de forma significativa tras la isquemia, aunque puede que el marcador elegido no sea el más idóneo o que la n sea insuficiente para encontrar diferencias porque otros estudios clínicos sí ven su aumento al menos a las 24 h tras un ictus (Cojocar et al., 2013). Aún así, parece lo suficientemente demostrado que tras la isquemia se produce una entrada importante de hierro al cerebro y que éste es responsable de formar especies oxidantes que contribuyen al daño tisular y, especialmente, al de la BHE (Won et al., 2011; Im et al., 2012).

No obstante, la medida del MDA sérico sí muestra que cuando los niveles de hierro son altos, el estrés oxidativo es mayor en situación basal, previo a la isquemia. Según la literatura, este daño parece enfocado al endotelio puesto que acumula el hierro que, a su vez, genera especies oxidantes (Mehta et al., 2004). Así, la sobrecarga de hierro contribuiría al debilitamiento de la BHE tanto de manera previa como en las primeras horas tras un ictus, aumentando la probabilidad de sufrir TH tras la terapia trombolítica (Millan et al., 2007). Además, los depósitos de hierro que se producen en el cerebro tras un ictus permanecen durante meses (Kondo et al., 1995), por lo que la evolución de los pacientes podría ser también peor en el caso de presentar niveles altos de hierro, particularmente si han sufrido TH.

Independientemente de que las ROS puedan provocar la degeneración endotelial, también desencadenan uno de los mecanismos activos de apertura de la BHE al promover una desorganización de las proteínas de las TJs, principalmente ZO-1 (Van der Goes et al., 2001) y claudina (Lee et al., 2004). Esto ocurre por la activación de la vía ROS/RhoA/PI3K/PKB que finaliza en un cambio en la fosforilación de las proteínas de las TJs que las desacopla (Fischer et al., 2005; Schreiber et al., 2007). Además, se ha comprobado que las ROS son capaces de inducir las MMPs, especialmente la MMP-9 (Haorah et al., 2007; Harada et al., 2012), y de activarlas por S-nitrosilación (Gu et al., 2002).

El segundo de los posibles mecanismos implicados en la TH es la infiltración de células inmunes, concretamente de neutrófilos, que contribuyen al daño a la BHE. A este respecto, se cuantificó a las 24 h la extravasación de este tipo de células observándose

que en la isquemia permanente existe una infiltración notable, que es más o menos de igual magnitud pese a que se reperfundida de manera temprana. Probablemente, el menor volumen de infarto atraiga un menor número de neutrófilos al foco isquémico, pero la recanalización arterial facilitaría la llegada a dicha zona respecto a la isquemia permanente, por lo que el recuento total de las células infiltradas no resulta alterado de manera significativa. Así, cuando el tamaño del infarto es máximo y existe perfusión, como ocurre en la recanalización arterial tardía, aumenta mucho la infiltración respecto a una isquemia permanente. Presumiblemente, esto ocurre porque la recanalización arterial facilita la llegada de las células blancas al foco isquémico y porque el efecto llamada es máximo. Curiosamente, pese a que los datos recogidos en la presente tesis doctoral muestran que la sobrecarga de hierro no provoca un infarto de mayor tamaño en varios grupos de tratamiento, en todos ellos aumenta el número de neutrófilos infiltrados. Esto podría deberse a que el hierro, al exacerbar el daño, provoca una mayor liberación de quimioquinas y citoquinas que reclutan a los neutrófilos y los activan y, al tiempo, promueven el aumento de la permeabilidad de la BHE (Stamatovic et al., 2003; Hosomi et al., 2005), probablemente por el mismo mecanismo que ROS, la activación de la vía RhoA/PI3K/PKB (Dimitrijevic et al., 2006). Además, durante la propia infiltración de los neutrófilos, éstos se adhieren a las paredes vasculares y contribuyen de forma determinante al daño a la BHE y a la desorganización de las TJs (Bolton et al., 1998), ya que liberan especies oxidantes, citoquinas y proteasas durante el proceso. Así, a mayor recuento de neutrófilos infiltrados mayor daño a la BHE y mayor daño (Rosell et al., 2008).

Finalmente, el último de los mecanismos implicados en la TH que se ha estudiado es la participación de las MMPs, analizando para ello tanto su expresión en el tejido isquémico como su comportamiento como marcador de TH en sangre, aspecto que se discute en el siguiente capítulo. En tejido se determinó la expresión y localización de MMP-9 a las 24 h de la isquemia mediante inmunofluorescencia y densitometría de la señal, no observándose inducción alguna de esta proteasa ni tras la isquemia, ni tras la terapia trombolítica ni con la sobrecarga de hierro, lo cual constituye una limitación del estudio al no poder vincularse sus niveles con la TH. La sobreexpresión y activación de la MMP-9 tras la isquemia (para revisión ver (Zhao et al., 2007; Yang and Rosenberg, 2011)) y tras la administración de t-PA (Wang et al., 2003; Suzuki et al., 2009) ha sido ampliamente descrita por multitud de autores, aunque bien es cierto que se ha observado empleando otras técnicas, fundamentalmente *western-blot* y/o zimografía del

tejido afectado y en otros modelos de isquemia que generan una lesión considerablemente mayor, fundamentalmente el intraluminal. De hecho, los resultados de la zimografía *in situ* presentados en esta tesis doctoral y discutidos en la caracterización molecular de la TH apoyan tanto la sobreexpresión como la activación de esta proteasa tras el tratamiento trombolítico, en este caso a 2 h post-isquemia. Por lo tanto, probablemente, la técnica empleada en este estudio para la detección de MMP-9 en el tejido isquémico no ha sido suficientemente sensible y/o el modelo TIS no genera un daño lo suficientemente extenso. Aún así, la inmunohistoquímica sí que muestra una tendencia (que no alcanza significación estadística, quizás, por un insuficiente tamaño muestral) a una mayor expresión de esta proteasa, con una localización preferentemente endotelial, en los grupos tratados con t-PA a las 3 h de la isquemia, que presentan TH independientemente de los niveles de hierro.

La literatura acepta ampliamente que la MMP-9 se eleva en el tejido isquémico sobre las 6-12 h post-isquemia, alcanza su máximo sobre las 24h y permanece alterada al menos durante la primera semana. Su aumento ha sido asociado claramente a la disrupción de la BHE, especialmente a aquella que ocurre en una segunda fase, antes de las 24 h, en contraposición con la apertura de la barrera que mediaba MMP-2 de forma más temprana. Sin embargo, existe controversia acerca del tipo celular que produce la MMP-9, existiendo pocos estudios que muestren inmunohistoquímicas claras acerca de su localización. Pese a haberse demostrado que resulta inducida en varios tipos celulares tales como astrocitos, neuronas o microglía, donde ha sido asociada a daño neuronal y más tardíamente a plasticidad, migración y mecanismos de reparación (para revisión ver (Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2007)), parece que su contribución a la TH queda mediada por su sobreexpresión en dos tipos celulares: neutrófilos y endotelio (Justicia et al., 2003).

Las células inmunes infiltradas, especialmente los neutrófilos, presentan un alto contenido en esta proteasa, almacenada en gránulos que son vertidos al exterior en presencia del estímulo adecuado. Así, ante un daño tisular, como el que ocurre durante la isquemia, los neutrófilos son reclutados al foco de la lesión y comienzan a infiltrarse, activándose y liberando sus gránulos en el proceso. Como ya se ha dicho anteriormente, éstos liberan MMP-9 que participa en la degradación de la MEC (Justicia et al., 2003; Gidday et al., 2005; Rosell et al., 2008; Ludewig et al., 2013). Así, en humanos, se ha encontrado un alto número de neutrófilos ricos en MMP-9 en los alrededores de vasos sanguíneos de la zona infartada que han sufrido TH (Rosell et al., 2008). Además, se ha

demostrado que la abolición de la infiltración empleando un anticuerpo anti-ICAM-1 impide el aumento de MMP-9 tras la isquemia (Justicia et al., 2003), aunque en este caso no se cuantificaron las hemorragias y el efecto puede deberse a diversos mecanismos. De forma semejante, Ludewig y colaboradores observaron que la mutación en la proteína *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* aumentaba la infiltración de neutrófilos ricos en esta proteasa que promovían el daño a la BHE (Ludewig et al., 2013). El conjunto de estos datos sugiere que este tipo de granulocitos son la fuente mayoritaria de la MMP-9 que induce la apertura de la BHE sobre las 12-24 h tras la isquemia. Sin embargo, no se ha observado que la depleción de neutrófilos frene la TH (Harris et al., 2005), aunque el modelo de isquemia experimental empleado por Harris y colaboradores no producía, probablemente, grandes sangrados. Así, el papel de dichas células inmunes en la TH permanece sin aclarar.

La MMP-9 de origen endotelial también podría ser clave en el proceso, aunque pocos son los trabajos muestran una localización endotelial de la MMP-9 inducida tras la isquemia (Justicia et al., 2003). Las tinciones realizadas en el presente trabajo mediante inmunohistoquímica muestran una localización de la MMP-9 claramente endotelial especialmente exacerbada en los animales que sufrían TH. Amantea y colaboradores, mediante zimografía *in situ*, mostraron que tras la isquemia se induce la actividad gelatinasa en vasos, también descrita en esta tesis doctoral, y que al no colocalizar con MMP-2 ha de deberse a la MMP-9 (Amantea et al., 2008). También son numerosos los estudios *in vitro* que muestran una inducción de esta proteasa en el endotelio isquémico, promovida por la activación del factor de transcripción NF- κ B y/o por las ROS (Harada et al., 2012). Además de la expresión, la isquemia también favorece la activación de la MMP-9, mediada por las mismos ROS que la inducen (Gu et al., 2002), o por MMP-3 mediante proteólisis (Gurney et al., 2006). En cualquier caso, una vez inducida y activa, la MMP-9 podría estar degradando algunas de las proteínas de las TJs, como ZO-1 (Asahi et al., 2001) y claudina-5 (Yang et al., 2007). Sin embargo, el principal daño a la BHE parece mediado por su secreción al entorno vascular, donde degrada la lámina basal al mediar la proteólisis de fibronectina, de laminina y, sobre todo, de colágeno (para revisión ver (Jickling et al., 2014)).

El t-PA administrado a los pacientes parece participar en la disrupción de la BHE, produciendo incluso TH, por varios mecanismos. Por un lado, al mediar reperusión podría exacerbar la infiltración y producción de especies oxidantes (Lukic-Panin et al., 2010). Por otro lado, el t-PA activa el plasminógeno a plasmina, la cual, en el entorno

vascular contribuye a la degradación de la MEC, debilitando el endotelio. Por último, algunos autores destacan que induce las MMPs, fundamentalmente MMP-2 y 9 (Aoki et al., 2002; Sumii and Lo, 2002; Tsuji et al., 2005). Parece que esta inducción queda mediada por la unión del t-PA al LRP en el endotelio, lo que activa el factor de transcripción NF- κ B e induce MMP-9 (Wang et al., 2003; Harada et al., 2012). Sin embargo, evidencias más recientes apuntan a que el t-PA media la disrupción de BHE sin implicar a esta proteasa (Yepes et al., 2003; Copin et al., 2011), posiblemente induciendo la MMP-3 a través del mismo LRP (Suzuki et al., 2009) que a su vez activa a la MMP-9.

2.4. MARCADORES SANGUÍNEOS DE LA TH

La asociación de la MMP-9 con la apertura de la BHE parece indiscutible hasta tal punto que constituye el mejor marcador plasmático de la TH. Así, en la clínica, se ha mostrado que los niveles séricos de esta proteasa se asocian a mayor probabilidad de desarrollar sangrados tras un ictus (Montaner et al., 2001; Castellanos et al., 2003; Inzitari et al., 2013). Castellanos y colaboradores comprobaron que los pacientes que desarrollan TH relevante o de tipo parenquimal presentan en admisión niveles elevados tanto de MMP-9 sérica como de fibronectina celular (Castellanos et al., 2007). En clínica, debido a la imposibilidad de realizar una toma sanguínea basal antes del ictus, se trabaja con determinaciones en admisión, 1-6 h tras la isquemia. Por ello, resulta imposible saber si los marcadores estudiados se han elevado en las primeras horas como consecuencia de un mayor daño o si estaban ya elevados antes del infarto e intervienen exacerbando la lesión. En cualquier caso, su valor como marcador pronóstico es indiscutible, siendo importante determinar si aparecen en sangre como causa o consecuencia del daño para elucidar los mecanismos en los que participa.

Como se ha explicado anteriormente, numerosos estudios muestran que la MMP-9 no se induce durante las primeras horas en el cerebro isquémico (Planas et al., 2001); por tanto, o bien los pacientes con esta proteasa elevada en admisión presentaban unos valores altos pre-ictus o bien esta proteasa se libera a la sangre en las primeras horas del infarto pero de otro origen diferente al cerebral. Para conocer su cinética se determinó la concentración sérica de esta proteína a 0, 3, 6 y 24 h en diferentes grupos experimentales tratados con t-PA a las 20 min, 1 o 3 h o sometidos a isquemia permanente así como en los respectivos animales Sham.

Los resultados sugieren que la MMP-9 no se eleva en sangre tras la isquemia porque no hay alteración de sus niveles en los grupos MCAO, permanentemente ocluidos, ni en los animales Sham tanto tratados con salino como con t-PA. Sin embargo, en los grupos reperfundidos con dicho fármaco, a los 20 min, a 1 o a 3 h post-isquemia, aparece una elevación de sus niveles proteicos, determinados por ELISA, y de su actividad, medida por zimografía. Dicho aumento es siempre transitorio y posterior a la reperfusión, sobre las 3 h en los grupos tratados con t-PA a los 20 minutos y a 1 h post-isquemia y sobre las 6 h en el tratamiento a 3 h. La sobrecarga de hierro podría facilitar la activación de esta MMP-9 por un mecanismo ROS dependiente, ya que aumenta la forma activa respecto a los animales controles pero no altera sus niveles, aunque sólo en el grupo tratado con t-PA a los 20 min. También se analizó la cinética de MMP-2, aunque no se observaron variaciones en ninguno de los grupos ni tiempos estudiados. Pocos trabajos experimentales han estudiado la cinética de las MMPs tras un ictus, destacando el de Heo y colaboradores que observaron que la MMP-9 aumenta en plasma de manera transitoria poco después de la reperfusión (Heo et al., 1999). Como no estudiaron lo que ocurría en un modelo permanente, ellos concluyeron que era la isquemia y no la reperfusión la que provocaba el aumento transitorio de esta proteasa, pero los resultados aquí presentados demuestran que sus niveles sólo se alteran significativamente tras la reperfusión. Además, este estudio también corrobora que la MMP-2 sérica no se altera en las primeras 24 h tras un ictus, pese a que se eleve en tejido.

Si la MMP-9 no se eleva en el parénquima nervioso durante las primeras 24 h, pero sí lo hace en sangre si se produce reperfusión, ¿qué tipo celular es el que la está liberando y por qué mecanismo? Justo tras la reperfusión va a verse exacerbada la producción de ROS y, como ya se ha discutido anteriormente, éstas constituyen un estímulo muy fuerte tanto para la inducción de la expresión de MMP-9 (Harada et al., 2012) como para su activación (Gu et al., 2002). La fuente más probable de dicha proteasa son tanto los neutrófilos como el endotelio. Por un lado, los neutrófilos tienen un alto contenido de MMP-9 almacenada en gránulos que liberan cuando se activan. También apoya la hipótesis de que el aumento detectado en suero provenga, al menos en parte, de los neutrófilos el hecho de que la reperfusión se logró administrando t-PA, el cual parece promover la desgranulación de estas células, que liberan así su contenido de MMP-9 al plasma (Cuadrado et al., 2008). Por otro lado, el endotelio interviene en la formación de esta proteasa por mecanismos t-PA y ROS dependientes, ambos

presentes durante la reperfusión (Harada et al., 2012). Así, en los animales sham tratados con t-PA no se ve un claro aumento de la MMP-9 a 3 y 6 h tras la cirugía, porque el t-PA promovería sólo alguno de estos mecanismos. Tampoco se observa en los animales MCAO, tratados con salino, porque la isquemia sólo promueve la elevación y activación de MMP-9 mediante las ROS. Es en los animales isquémicos tratados con el fibrinolítico donde ambos mecanismos están presentes: las ROS se encuentran exacerbadas por la reperfusión y, además, el t-PA está presente, lo que lleva a la elevación y activación de MMP-9.

La determinación de los niveles de MMP-9 a las 24 h es especialmente relevante, puesto que sólo los grupos con TH, aquellos que han sido tratados con t-PA a las 3 h de la isquemia, mantienen elevados tanto los niveles como la actividad de esta proteasa, independientemente de su niveles de hierro. A este tiempo también se observaba un marcaje claramente endotelial de la MMP-9 mediante inmunohistoquímica y de nuevo sólo en los grupos con TH. Ambos hechos corroboran la asociación de esta proteasa con la aparición de hemorragias en la zona del infarto (para revisión ver (Jickling et al., 2014)).

Si los niveles de MMP-9 no se alteran en las primeras horas tras un ictus, salvo cuando hay reperfusión, ¿por qué está elevada en los pacientes de ictus más propensos a sufrir TH? Según los resultados obtenidos, la explicación más probable es que esta proteasa se eleva en sangre como consecuencia de otras enfermedades que lesionan el endotelio, que además son un factor de riesgo para el ictus isquémico y hemorrágico. Tal es el caso de la aterosclerosis (Watanabe and Ikeda, 2004) o de la diabetes (Hopps and Caimi, 2012). Así, tras un ictus, debido a un endotelio ya debilitado, los pacientes son más propensos a sufrir una disrupción de la BHE exacerbada y sangrados. Algo semejante debe ocurrir con la fibronectina celular, que también aparece elevada en admisión en los pacientes que posteriormente desarrollan TH. Esta proteína forma parte de la lámina basal y es degradada por varias proteasas, MMP-9 entre ellas. Pese a asociarse a TH, la determinación de sus niveles séricos, recogida en el presente trabajo, no mostró alteración alguna tras la isquemia por lo que los pacientes más propensos al sangrado ya debían tener elevados los niveles de fibronectina antes del ictus. Así, se ha demostrado que esta proteína se induce en el plasma en pacientes obesos (Cucuianu et al., 1996), enfermos de corazón (Song et al., 2001) o diabéticos (Kanters et al., 2001), todos ellos factores de riesgo del ictus y de la TH.

Por lo tanto, pese a que los niveles de ambas proteínas, MMP-9 y fibronectina celular, parecen predecir la probabilidad de TH en los pacientes de ictus, éstas podrían indicar un estado de deterioro previo del endotelio y no un mecanismo de daño desencadenado por el ictus. En cualquier caso, su utilidad como marcador de este temido proceso es indiscutible, lo que sugiere que la terapia trombolítica podría excluirse de aquellos pacientes que al ingreso presenten niveles altos de estos u otros marcadores.

A grayscale microscopic image of neurons, showing several cell bodies (soma) with branching dendrites and axons. The neurons are stained, likely with a silver or gold stain, against a light background. The branching pattern is complex and interconnected.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los datos de la presente tesis doctoral confirman que la inyección de trombina en la arteria cerebral media (ACM) promueve su oclusión tromboembólica, llevando al establecimiento de un infarto cerebral restringido al córtex.
2. En dicho modelo, el tratamiento temprano, hasta 1 h, con el activador tisular del plasminógeno (t-PA) produce la recanalización arterial, disminuyendo el tamaño de la lesión, los déficits neurológicos y las hemorragias observadas.
3. La reperusión tardía con t-PA, más allá de las 2 h, no sólo no rescata parte del tejido comprometido por la isquemia, sino que agrava el daño a la BHE y lleva a la aparición de la TH, constituyendo un modelo adecuado para el estudio de dicho fenómeno.
4. El modelo tromboembólico *in situ* ofrece un gran potencial de traslación de la investigación básica al reproducir hechos observados en la clínica, como son el beneficio de la reperusión temprana, la TH asociada a recanalización tardía, la reperusión espontánea por autólisis y la resistencia al tratamiento fibrinolítico.
5. Los animales con TH inducida por trombolisis tardía presentan una inducción de la MMP-9 vascular así como un aumento de la actividad gelatinasa en el tejido isquémico.
6. La ferritina sérica no se eleva durante las primeras 24 h tras un ictus experimental por oclusión distal de la ACM, por lo que sigue constituyendo un marcador fiable de los depósitos de hierro en el organismo tras un episodio isquémico.
7. La sobrecarga de hierro acelera la muerte del tejido comprometido por la isquemia al aumentar el tamaño del infarto en diferentes modelos de isquemia seguidos de reperusión temprana, pero no cuando ésta es tardía o no existe reperusión.
8. La sobrecarga de hierro anticipa la aparición de la TH asociada a la reperusión, aumentando el edema y el área hemorrágica en el tratamiento con t-PA a 1 h después de la isquemia.
9. Los animales con sobrecarga de hierro responden mejor al tratamiento fibrinolítico al presentar una mayor tasa de reperusión y ocurrir ésta antes que en los animales controles.
10. La sobrecarga de hierro acorta la ventana terapéutica del tratamiento con t-PA al disminuir sus beneficios y agravar sus efectos secundarios, lo que sugiere la revisión de

los criterios de inclusión en la terapia trombolítica para los pacientes con niveles elevados de hierro, hecho de una enorme relevancia clínica.

11. La sobrecarga de hierro aumenta la infiltración de neutrófilos en el tejido isquémico, efecto que aumenta en animales con TH.

12. Ni la isquemia, ni el t-PA, ni la sobrecarga de hierro alteran los niveles séricos de MMP-2 o de fibronectina celular, por lo que dichas proteínas no son unos buenos marcadores de la TH o de pronóstico tras un ictus.

13. La sobrecarga de hierro es suficiente para inducir un estrés oxidativo celular al aumentar el MDA sérico antes de la isquemia, pero no tras ella.

14. La MMP-9 sérica se eleva y activa de manera transitoria tras la recanalización con t-PA, mientras que su elevación y activación a tiempos más tardíos se asocia a TH, por lo que resulta útil como marcador pronóstico de ésta.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13-25.
- Abboud S, Haile DJ (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906-19912.
- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leiendecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thomson E, Sholinsky P (2005) Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 352:1769-1778.
- Aisen P, Leibman A, Zweier J (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 253:1930-1937.
- Albers GW, Clark WM, Madden KP, Hamilton SA (2002) ATLANTIS trial: results for patients treated within 3 hours of stroke onset. *Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke*. *Stroke* 33:493-495.
- Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, Gorelick PB, Hurn P, Liebeskind DS, Nogueira RG, Saver JL (2011) Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke* 42:2645-2650.
- Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *NatRevNeurosci* 2:734-744.
- Allen CL, Bayraktutan U (2008) Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke* 3:105-116.
- Amantea D, Corasaniti MT, Mercuri NB, Bernardi G, Bagetta G (2008) Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 152:8-17.
- Amantea D, Russo R, Gliozzi M, Fratto V, Berliocchi L, Bagetta G, Bernardi G, Corasaniti MT (2007) Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol* 82:149-169.
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823:1468-1483.
- Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD (2009) Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol* 25:129-135.
- Ansar S, Chatzikonstantinou E, Thiagarajah R, Tritschler L, Fatar M, Hennerici MG, Meairs S (2014) Pro-Inflammatory Mediators and Apoptosis Correlate to rt-PA Response in a Novel Mouse Model of Thromboembolic Stroke. *PLoS One* 9:e85849.

- Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH (2002) Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 33:2711-2717.
- Armengou A, Davalos A, Fernandez-Real JM, Castillo J (1998) Serum ferritin concentrations are not modified in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* 29:258-260.
- Armstead WM, Nassar T, Akkawi S, Smith DH, Chen XH, Cines DB, Higazi AA (2006) Neutralizing the neurotoxic effects of exogenous and endogenous tPA. *Nat Neurosci* 9:1150-1155.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97:512-523.
- Arnold S, Kadenbach B (1999) The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett* 443:105-108.
- Arnould MC, Grandin CB, Peeters A, Cosnard G, Duprez TP (2004) Comparison of CT and three MR sequences for detecting and categorizing early (48 hours) hemorrhagic transformation in hyperacute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:939-944.
- Arosio P, Levi S (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 33:457-463.
- Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH (2000) Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:452-457.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH (2001) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 21:7724-7732.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725.
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977) Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8:51-57.
- Baron JC (2001) Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:2-8.
- Bartlett WP, Li XS, Connor JR (1991) Expression of transferrin mRNA in the CNS of normal and jimpy mice. *J Neurochem* 57:318-322.
- Bazan NG (1989) Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 559:1-16.
- Beard JL, Murray-Kolb LE, Rosales FJ, Solomons NW, Angelilli ML (2006) Interpretation of serum ferritin concentrations as indicators of total-body iron stores in survey populations: the role of biomarkers for the acute phase response. *Am J Clin Nutr* 84:1498-1505.
- Begley DJ (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 10:1295-1312.
- Begley DJ, ed (2007) *Structure and function of the blood-brain barrier*: CRC Press, Boca Raton.

- Bejot Y, Benatru I, Rouaud O, Fromont A, Besancenot JP, Moreau T, Giroud M (2007) Epidemiology of stroke in Europe: geographic and environmental differences. *J Neurol Sci* 262:85-88.
- Bejot Y, Caillier M, Ben Salem D, Couvreur G, Rouaud O, Osseby GV, Durier J, Marie C, Moreau T, Giroud M (2008) Ischaemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1344-1348.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Brillault J, Chuquet J, Nouvelot A, MacKenzie ET, Bu G, Cecchelli R, Touzani O, Vivien D (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111:2241-2249.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A (2008) Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep* 60:600-622.
- Bishop GM, Robinson SR (2001) Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res* 907:175-187.
- Bishop GM, Robinson SR, Liu Q, Perry G, Atwood CS, Smith MA (2002) Iron: a pathological mediator of Alzheimer disease? *Dev Neurosci* 24:184-187.
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH (1998) Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86:1245-1257.
- Broderick JP et al. (2013) Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med* 368:893-903.
- Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111:483-495.
- Busch E, Kruger K, Hossmann KA (1997) Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778:16-24.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25:14-15.
- Cammermyer J (1947) Deposition of iron in paraventricular areas of the human brain in hemochromatosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 6:111-127.
- Campos F, Qin T, Castillo J, Seo JH, Arai K, Lo EH, Waeber C (2013) Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model. *Stroke* 44:505-511.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93:4406-4417.
- Caplan LR (2011) Stroke classification: a personal view. *Stroke* 42:53-6.
- Carandang R, Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Kannel WB, Wolf PA (2006) Trends in incidence, lifetime risk, severity, and 30-day mortality of stroke over the past 50 years. *JAMA* 296:2939-2946.
- Carty M, Bowie AG (2011) Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochem Pharmacol* 81:825-837.

- Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, Harford JB (1988) Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240:924-928.
- Castellanos M, Puig N, Carbonell T, Castillo J, Martinez J, Rama R, Davalos A (2002) Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 952:1-6.
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Davalos A (2003) Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 34:40-46.
- Castellanos M, Sobrino T, Millan M, Garcia M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez dIO, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Davalos A (2007) Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke* 38:1855-1859.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129:307-321.
- Cicone A, Valvassori L, Nichelatti M, Sgoifo A, Ponzio M, Sterzi R, Boccardi E (2013) Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 368:904-913.
- Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* 282:2019-2026.
- Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A (2013) Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 51:97-106.
- Copin JC, Gasche Y (2008) Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats. *Brain Res* 1243:161-166.
- Copin JC, Bengualid DJ, Da Silva RF, Kargiotis O, Schaller K, Gasche Y (2011) Recombinant tissue plasminogen activator induces blood-brain barrier breakdown by a matrix metalloproteinase-9-independent pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse. *Eur J Neurosci* 34:1085-1092.
- Cox TC, Bawden MJ, Martin A, May BK (1991) Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J* 10:1891-1902.
- Crowe A, Morgan EH (1996) Iron and copper interact during their uptake and deposition in the brain and other organs of developing rats exposed to dietary excess of the two metals. *J Nutr* 126:183-194.
- Crumrine RC, Marder VJ, Taylor GM, Lamanna JC, Tsipis CP, Scuderi P, Petteway SR, Jr., Arora V (2011) Intra-arterial administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) causes more intracranial bleeding than does intravenous rt-PA in a transient rat middle cerebral artery occlusion model. *Exp Transl Stroke Med* 3:10.
- Cuadrado E, Ortega L, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Fernandez-Cadenas I, Rosell A, Montaner J (2008) Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 84:207-214.

- Cucuianu M, Bodizs G, Duncea I, Colhon D (1996) Plasma fibronectin in overweight men and women: correlation with serum triglyceride levels and serum cholinesterase activity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7:779-785.
- Cushman WC, Evans GW, Byington RP, Goff DC, Jr., Grimm RH, Jr., Cutler JA, Simons-Morton DG, Basile JN, Corson MA, Probstfield JL, Katz L, Peterson KA, Friedewald WT, Buse JB, Bigger JT, Gerstein HC, Ismail-Beigi F (2010) Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 362:1575-1585.
- Chakraborty B, Vishnoi G, Goswami B, Gowda SH, Chowdhury D, Agarwal S (2012) Lipoprotein(a), Ferritin, and Albumin in Acute Phase Reaction Predicts Severity and Mortality of Acute Ischemic Stroke in North Indian Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*
- Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM (1984) Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 34:315-320.
- Chance B, Williams GR (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 217:383-393.
- Chang DI, Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Abumiya T, Mazar AP, del Zoppo GJ (2003) Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1408-1419.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (2001) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.
- Chen PH, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D (2012) Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther* 18:452-456.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743.
- Chen ZL, Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91:917-925.
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA (2004) Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx* 1:36-45.
- Chi SI, Wang CK, Chen JJ, Chau LY, Lin TN (2000) Differential regulation of H- and L-ferritin messenger RNA subunits, ferritin protein and iron following focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience* 100:475-484.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
- Choi KH, Park MS, Kim JT, Nam TS, Choi SM, Kim BC, Kim MK, Cho KH (2011) The serum ferritin level is an important predictor of hemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol.*
- Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES, Jr., Pinsky DJ (1997) Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 28:2296-2302.
- Christensen H, Boysen G, Johannesen HH, Christensen E, Bendtzen K (2002) Deteriorating ischaemic stroke. cytokines, soluble cytokine receptors, ferritin,

- systemic blood pressure, body temperature, blood glucose, diabetes, stroke severity, and CT infarction-volume as predictors of deteriorating ischaemic stroke. *J Neurol Sci* 201:1-7.
- Danielisova V, Gottlieb M, Burda J (2002) Iron deposition after transient forebrain ischemia in rat brain. *Neurochem Res* 27:237-242.
- Davalos A (2005) Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *CerebrovascDis* 20 Suppl 2:135-139.
- Davalos A, Fernandez-Real JM, Ricart W, Soler S, Molins A, Planas E, Genis D (1994) Iron-related damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 25:1543-1546.
- Davalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernandez-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R (2000) Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54:1568-1574.
- de Lange EC (2012) The physiological characteristics and transcytosis mechanisms of the blood-brain barrier (BBB). *Curr Pharm Biotechnol* 13:2319-2327.
- Deane R, Zheng W, Zlokovic BV (2004) Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. *J Neurochem* 88:813-820.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121:2115-2122.
- del Zoppo GJ (2006) Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 354:553-555.
- del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, Koziol JA (2007) Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke* 38:646-651.
- del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, Alberts MJ, Zivin JA, Wechsler L, Busse O, et al. (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* 32:78-86.
- Demougeot C, Van Hoecke M, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Mossiat C, Beley A, Marie C (2004) Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1080-1087.
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH (2001) Delayed rt-PA treatment in a rat embolic stroke model: diagnosis and prognosis of ischemic injury and hemorrhagic transformation with magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:964-971.
- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV (2006) Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:797-810.
- Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 17:5316-5326.
- Dorado L, Castano C, Millan M, Aleu A, de la Ossa NP, Gomis M, Lopez-Cancio E, Vivas E, Rodriguez-Campello A, Castellanos M, Davalos A (2013) Hemorrhagic risk of emergent endovascular treatment plus stenting in patients with acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22:1326-1331.

- Dore-Duffy P, LaManna JC (2007) Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal* 9:1363-1371.
- Duffy SJ, Biegelsen ES, Holbrook M, Russell JD, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA (2001) Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 103:2799-2804.
- Durand A, Chauveau F, Cho TH, Bolbos R, Langlois JB, Hermitte L, Wiart M, Berthezene Y, Nighoghossian N (2012) Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice. *PLoS One* 7:e50083.
- EASL (2010) EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 53:3-22.
- Eaton JW, Qian M (2002) Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* 32:833-840.
- Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D (2003) The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 116:3879-3891.
- Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* 120:2194-2205.
- Eisenstein RS (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 20:627-662.
- Elkind MS (2011) Epidemiology and risk factors. *Continuum (Minneap Minn)* 17:1213-1232.
- Erdemoglu AK, Ozbakir S (2002) Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur J Neurol* 9:633-637.
- Evstatiev R, Bukaty A, Jimenez K, Kulnigg-Dabsch S, Surman L, Schmid W, Eferl R, Lippert K, Scheiber-Mojdehkar B, Michael Kvasnicka H, Khare V, Gasche C (2014) Iron deficiency alters megakaryopoiesis and platelet phenotype independent of thrombopoietin. *Am J Hematol*.
- Fan X, Lo EH, Wang X (2013) Effects of minocycline plus tissue plasminogen activator combination therapy after focal embolic stroke in type 1 diabetic rats. *Stroke* 44:745-752.
- Fan X, Qiu J, Yu Z, Dai H, Singhal AB, Lo EH, Wang X (2012) A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes. *Stroke* 43:567-570.
- Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 383:245-254.
- Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP (2005) Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57:883-917.

- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1997) Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci* 825:179-193.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998) The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5:143-159.
- Feuerstein GZ, Zaleska MM, Krams M, Wang X, Day M, Rutkowski JL, Finklestein SP, Pangalos MN, Poole M, Stiles GL, Ruffolo RR, Walsh FL (2008) Missing steps in the STAIR case: a Translational Medicine perspective on the development of NXY-059 for treatment of acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:217-219.
- Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E, Ringelb AP, Lorenzano S, Manelfe C, Bozzao L (1999) Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke* 30:2280-2284.
- Fischer S, Wiesnet M, Renz D, Schaper W (2005) H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur J Cell Biol* 84:687-697.
- Fisher M (2003) Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 34:1539-1546.
- Fisher M, Albers GW (2013) Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke. *Ann Neurol* 73:4-9.
- Fisher M, Hanley DF, Howard G, Jauch EC, Warach S (2007) Recommendations from the STAIR V meeting on acute stroke trials, technology and outcomes. *Stroke* 38:245-248.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH (2009) Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40:2244-2250.
- Fisher M, Albers GW, Donnan GA, Furlan AJ, Grotta JC, Kidwell CS, Sacco RL, Wechsler LR (2005) Enhancing the development and approval of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry roundtable. *Stroke* 36:1808-1813.
- Frank B, Grotta JC, Alexandrov AV, Bluhmki E, Lyden P, Meretoja A, Mishra NK, Shuaib A, Wahlgren NG, Weimar C, Lees KR (2013) Thrombolysis in stroke despite contraindications or warnings? *Stroke* 44:727-733.
- Fraser PA (2011) The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 51:967-977.
- Fuentes B, Martinez-Sanchez P, de Lecinana MA, Egidio J, Reig-Rosello G, Diaz-Otero F, Sanchez V, Simal P, Ximenez-Carrillo A, Garcia-Pastor A, Ruiz-Ares G, Garcia-Garcia A, Masjuan J, Vivancos-Mora J, Gil-Nunez A, Diez-Tejedor E (2012) Efficacy of intravenous thrombolysis according to stroke subtypes: the Madrid Stroke Network data. *Eur J Neurol* 19:1568-1574.
- Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F (1999) Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* 282:2003-2011.

- Ganz T, Nemeth E (2012) Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823:1434-1443.
- Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Perez de la Ossa N, Davalos A, Serena J, Lizasoain I, Moro MA (2011) A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42:196-203.
- Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1393-1400.
- Gautier S, Petrault O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauters A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R (2003) Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* 34:2975-2979.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H558-568.
- Gingrich MB, Traynelis SF (2000) Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci* 23:399-407.
- Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke* 40:S111-114.
- Ginsberg MD, Pulsinelli WA (1994) The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 36:553-554.
- Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM (2002) Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 33:2123-2136.
- Go AS et al. (2013) Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127:e6-e245.
- Go AS et al. (2014) Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the american heart association. *Circulation* 129:e28-e292.
- Green A, Odergren T, Ashwood T (2003) Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci* 24:402-408.
- Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, Lipton SA (2005) A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 25:6401-6408.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297:1186-1190.
- Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE (1996) Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci* 16:2220-2225.

- Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA (2006) Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* 23:87-96.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274:1017-1025.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352:1245-1251.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359:1317-1329.
- Hacke W et al. (2004) Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363:768-774.
- Hamel E (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985) 100:1059-1064.
- Hansen AJ (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101-148.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y (2007) Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 101:566-576.
- Harada K, Suzuki Y, Yamakawa K, Kawakami J, Umemura K (2012) Combination of reactive oxygen species and tissue-type plasminogen activator enhances the induction of gelatinase B in brain endothelial cells. *Int J Neurosci* 122:53-59.
- Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC (2005) Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci* 6:49.
- Harston GW, Sutherland BA, Kennedy J, Buchan AM (2010) The contribution of L-arginine to the neurotoxicity of recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischemia: a review of rtPA neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1804-1816.
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185.
- Heiss WD (2012) The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci* 1268:26-34.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153:543-553.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297.

- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624-633.
- Hillered L, Smith ML, Siesjö BK (1985) Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:259-266.
- Hintze KJ, Theil EC (2005) DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15048-15052.
- Holmin S, Mathiesen T (2000) Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg* 92:108-120.
- Hopps E, Caimi G (2012) Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. *Eur J Intern Med* 23:99-104.
- Hornig CR, Dorndorf W, Agnoli AL (1986) Hemorrhagic cerebral infarction--a prospective study. *Stroke* 17:179-185.
- Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song XY, Kohno M (2005) Tumor necrosis factor- α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:959-967.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hossmann KA (2012) The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1310-1316.
- Hoy DG, Rao C, Hoa NP, Suhardi S, Lwin AM (2012) Stroke mortality variations in South-East Asia: empirical evidence from the field. *Int J Stroke*.
- Hu Q, Ma Q, Zhan Y, He Z, Tang J, Zhou C, Zhang J (2011) Isoflurane enhanced hemorrhagic transformation by impairing antioxidant enzymes in hyperglycemic rats with middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 42:1750-1756.
- Hutter-Paier B, Crygar E, Fruhwirth M, Temmel I, Windisch M (1998) Further evidence that Cerebrolysin protects cortical neurons from neurodegeneration in vitro. *J Neural Transm Suppl* 53:363-372.
- Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17:796-808.
- Ihle-Hansen H, Thommessen B, Wyller TB, Engedal K, Fure B (2012) Risk factors for and incidence of subtypes of ischemic stroke. *Funct Neurol* 27:35-40.
- Im DS, Jeon JW, Lee JS, Won SJ, Cho SI, Lee YB, Gwag BJ (2012) Role of the NMDA receptor and iron on free radical production and brain damage following transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1455:114-123.
- Inzitari D et al. (2013) MMP9 Variation After Thrombolysis Is Associated With Hemorrhagic Transformation of Lesion and Death. *Stroke* 44:2901-2903.
- Ishiguro M, Mishiro K, Fujiwara Y, Chen H, Izuta H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Satoh M, Iwama T, Hara H (2010) Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *PLoS One* 5:e15178.

- Ishikawa M, Zhang JH, Nanda A, Granger DN (2004) Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Front Biosci* 9:1339-1347.
- Ishimaru H, Ishikawa K, Ohe Y, Takahashi A, Tatemoto K, Maruyama Y (1996) Activation of iron handling system within the gerbil hippocampus after cerebral ischemia. *Brain Res* 726:23-30.
- Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
- Jacobsen EJ, VanDoornik FJ, Ayer DE, Belonga KL, Braughler JM, Hall ED, Houser DJ (1992) 2-(Aminomethyl)chromans that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma and ischemia. *J Med Chem* 35:4464-4472.
- Jankun J, Landeta P, Pretorius E, Skrzypczak-Jankun E, Lipinski B (2014) Unusual clotting dynamics of plasma supplemented with iron(III). *Int J Mol Med* 33:367-372.
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 70:68-78.
- Jeong SY, David S (2003) Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* 278:27144-27148.
- Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, Sharp FR (2014) Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:185-199.
- Jin R, Yang G, Li G (2010) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis* 38:376-385.
- Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1430-1440.
- Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S (2006) Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem Biophys Res Commun* 339:1197-1203.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 298:229-317.
- Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R (2001) Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care* 24:323-327.
- Katchman AN, Hershkowitz N (1993) Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol* 70:1-7.
- Kaur D, Andersen J (2004) Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev* 3:327-343.
- Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM (2004) The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J Cereb Blood Flow Metab* 24:945-963.

- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274:20826-20832.
- Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA (2003) The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 12:119-126.
- Khatiri P, Wechsler LR, Broderick JP (2007) Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke* 38:431-440.
- Kidwell CS, Liebeskind DS, Starkman S, Saver JL (2001) Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century. *Stroke* 32:1349-1359.
- Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J, Alger JR, Nenov V, Ajani Z, Feng L, Meyer BC, Olson S, Schwamm LH, Yoo AJ, Marshall RS, Meyers PM, Yavagal DR, Wintermark M, Guzy J, Starkman S, Saver JL (2013) A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med* 368:914-923.
- Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F (1997) Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 96:3300-3307.
- Kilic E, Bahr M, Hermann DM (2001) Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations. *Stroke* 32:2641-2647.
- Kilic E, Kilic U, Bassetti CL, Hermann DM (2004) Intravenously administered recombinant tissue-plasminogen activator attenuates neuronal injury after mild focal cerebral ischemia in mice. *Neuroreport* 15:687-689.
- Kilic E, Kilic U, Bahr M, Hermann DM (2005) Tissue plasminogen activator-induced ischemic injury is reversed by NMDA antagonist MK-801 in vivo. *Neurodegener Dis* 2:49-55.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S (2003) Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol* 201:319-327.
- Kito G, Nishimura A, Susumu T, Nagata R, Kuge Y, Yokota C, Minematsu K (2001) Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey. *J Neurosci Methods* 105:45-53.
- Klein GM, Li H, Sun P, Buchan AM (1999) Tissue plasminogen activator does not increase neuronal damage in rat models of global and focal ischemia. *Neurology* 52:1381-1384.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR (2006) Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* (1985) 100:307-317.
- Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O, Neundorfer B, Heuschmann PU (2001) Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* 32:2735-2740.
- Kondo Y, Ogawa N, Asanuma M, Ota Z, Mori A (1995) Regional differences in late-onset iron deposition, ferritin, transferrin, astrocyte proliferation, and microglial activation after transient forebrain ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:216-226.

- Kontos CD, Wei EP, Williams JI, Kontos HA, Povlishock JT (1992) Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. *Am J Physiol* 263:H1234-1242.
- Korninger C, Collen D (1981) Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. *Thromb Haemost* 46:561-565.
- Kristian T (2004) Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium* 36:221-233.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201.
- Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:691-699.
- Kwak EL, Larochelle DA, Beaumont C, Torti SV, Torti FM (1995) Role for NF-kappa B in the regulation of ferritin H by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 270:15285-15293.
- Laine F, Jouannolle AM, Morcet J, Brigand A, Pouchard M, Lafraisse B, Mosser J, David V, Deugnier Y (2005) Phenotypic expression in detected C282Y homozygous women depends on body mass index. *J Hepatol* 43:1055-1059.
- Langlois d'Estaintot B, Santambrogio P, Granier T, Gallois B, Chevalier JM, Precigoux G, Levi S, Arosio P (2004) Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser144Ala. *J Mol Biol* 340:277-293.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA (2000) Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 31:3034-3040.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA (2001) Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitrone (PBN) and 2,2,6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke* 32:147-153.
- Larrue V, von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E (1997) Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 28:957-960.
- Larrue V, von Kummer RR, Muller A, Bluhmki E (2001) Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke* 32:438-441.
- Lawson DM, Treffry A, Artymiuk PJ, Harrison PM, Yewdall SJ, Luzzago A, Cesareni G, Levi S, Arosio P (1989) Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett* 254:207-210.
- Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, Petersen S, Rayner M (2006) Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* 27:1610-1619.
- Lee HS, Namkoong K, Kim DH, Kim KJ, Cheong YH, Kim SS, Lee WB, Kim KY (2004) Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 68:231-238.

- Lee I, Salomon AR, Yu K, Doan JW, Grossman LI, Huttemann M (2006) New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo. *Biochemistry* 45:9121-9128.
- Lee KR, Kawai N, Kim S, Sagher O, Hoff JT (1997) Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. *J Neurosurg* 86:272-278.
- Lee SR, Lok J, Rosell A, Kim HY, Murata Y, Atochin D, Huang PL, Wang X, Ayata C, Moskowitz MA, Lo EH (2007) Reduction of hippocampal cell death and proteolytic responses in tissue plasminogen activator knockout mice after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience* 150:50-57.
- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC (1999) Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 21:396-399.
- Li J, Yu L, Gu X, Ma Y, Pasqualini R, Arap W, Snyder EY, Sidman RL (2013) Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2410-2419.
- Li M, Zhang Z, Sun W, Koehler RC, Huang J (2011) 17beta-estradiol attenuates breakdown of blood-brain barrier and hemorrhagic transformation induced by tissue plasminogen activator in cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 44:277-283.
- Liguz-Leczna M, Ziemka-Nalecz M, Aleksy M, Kossut M, Skangiel-Kramska J, Nowicka D (2012) Comparison of matrix metalloproteinase activation after focal cortical ischemia in young adult and aged mice. *J Neurosci Res* 90:203-212.
- Lijnen HR (2001) Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* 936:226-236.
- Lipscomb DC, Gorman LG, Traystman RJ, Hurn PD (1998) Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* 29:487-492; discussion 493.
- Liu DZ, Ander BP, Xu H, Shen Y, Kaur P, Deng W, Sharp FR (2010) Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. *Ann Neurol* 67:526-533.
- Liu SS (1999) Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain--superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 31:367-376.
- Liu T, Young PR, McDonnell PC, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1993) Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mRNA expressed in cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 164:125-128.
- Liu X, Tu M, Kelly RS, Chen C, Smith BJ (2004) Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos* 32:132-139.
- Lok CN, Ponka P (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 274:24147-24152.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
- Lozano R et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2095-2128.

- Lu A, Clark JF, Broderick JP, Pyne-Geithman GJ, Wagner KR, Khatri P, Tomsick T, Sharp FR (2009) Mechanical reperfusion is associated with post-ischemic hemorrhage in rat brain. *Exp Neurol* 216:407-412.
- Ludewig P, Sedlacik J, Gelderblom M, Bernreuther C, Korkusuz Y, Wagener C, Gerloff C, Fiehler J, Magnus T, Horst AK (2013) Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Inhibits MMP-9-Mediated Blood-Brain-Barrier Breakdown in a Mouse Model for Ischemic Stroke. *Circ Res* 113:1013-1022.
- Lukic-Panin V, Deguchi K, Yamashita T, Shang J, Zhang X, Tian F, Liu N, Kawai H, Matsuura T, Abe K (2010) Free radical scavenger edaravone administration protects against tissue plasminogen activator induced oxidative stress and blood brain barrier damage. *Curr Neurovasc Res* 7:319-329.
- Lundelin K, Graciani A, Garcia-Puig J, Guallar-Castillon P, Taboada JM, Rodriguez-Artalejo F, Banegas JR (2012) Knowledge of stroke warning symptoms and intended action in response to stroke in Spain: a nationwide population-based study. *Cerebrovasc Dis* 34:161-168.
- MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y (2008) Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10:997-1030.
- Macrez R, Ali C, Toutirais O, Le Mauff B, Defer G, Dirnagl U, Vivien D (2011) Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 10:471-480.
- Maeda M, Furuichi Y, Noto T, Matsuoka N, Mutoh S, Yoneda Y (2009) Tacrolimus (FK506) suppresses rt-PA-induced hemorrhagic transformation in a rat thrombotic ischemia stroke model. *Brain Res* 1254:99-108.
- Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK (1998) Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 29:2171-2180.
- Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA (2004) Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem* 279:16254-16262.
- Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz AL (1989) Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 20:488-494.
- Matsuno H, Uematsu T, Umemura K, Takiguchi Y, Asai Y, Muranaka Y, Nakashima M (1993) A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29:165-173.
- May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, Noebels JL, Beffert U, Sweatt JD, Weeber EJ, Herz J (2004) Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* 24:8872-8883.
- McArthur KS, Quinn TJ, Dawson J, Walters MR (2011) Diagnosis and management of transient ischaemic attack and ischaemic stroke in the acute phase. *BMJ* 342:d1938.

- McColl BW, Rose N, Robson FH, Rothwell NJ, Lawrence CB (2010) Increased brain microvascular MMP-9 and incidence of haemorrhagic transformation in obese mice after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:267-272.
- McCormack JG, Denton RM (1993) The role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of oxidative phosphorylation in mammalian tissues. *Biochem Soc Trans* 21 (Pt 3):793-799.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Mehdiratta M, Kumar S, Hackney D, Schlaug G, Selim M (2008) Association between serum ferritin level and perihematoma edema volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 39:1165-1170.
- Mehta SH, Webb RC, Ergul A, Tawfik A, Dorrance AM (2004) Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R283-288.
- Melchor JP, Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 93:655-660.
- Meldrum B, Evans M, Griffiths T, Simon R (1985) Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br J Anaesth* 57:44-46.
- Meng W, Wang X, Asahi M, Kano T, Asahi K, Ackerman RH, Lo EH (1999) Effects of tissue type plasminogen activator in embolic versus mechanical models of focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1316-1321.
- Meretoja A, Kaste M, Roine RO, Juntunen M, Linna M, Hillbom M, Marttila R, Erila T, Rissanen A, Sivenius J, Hakkinen U (2011) Trends in treatment and outcome of stroke patients in Finland from 1999 to 2007. PERFECT Stroke, a nationwide register study. *Ann Med* 43 Suppl 1:S22-30.
- Millan M, Sobrino T, Arenillas JF, Rodriguez-Yanez M, Garcia M, Nombela F, Castellanos M, de la Ossa NP, Cuadras P, Serena J, Castillo J, Davalos A (2008) Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. *Dis Markers* 25:181-188.
- Millan M, Sobrino T, Castellanos M, Nombela F, Arenillas JF, Riva E, Cristobo I, Garcia MM, Vivancos J, Serena J, Moro MA, Castillo J, Davalos A (2007) Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. *Stroke* 38:90-95.
- Miller RJ, Meucci O (1999) AIDS and the brain: is there a chemokine connection? *Trends Neurosci* 22:471-479.
- Millerot-Serruot E, Bertrand N, Mossiat C, Faure P, Prigent-Tessier A, Garnier P, Bejot Y, Giroud M, Beley A, Marie C (2008) Temporal changes in free iron levels after brain ischemia Relevance to the timing of iron chelation therapy in stroke. *Neurochem Int* 52:1442-1448.
- Millerot E, Prigent-Tessier AS, Bertrand NM, Faure PJ, Mossiat CM, Giroud ME, Beley AG, Marie C (2005) Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1386-1393.
- Mohr J.P. CDW, Grotta J.C., Weir B., Wolf P.A., ed (2004) *Stroke: pathophysiology, diagnosis and management*: Churchill Livingstone.

- Molina CA, Alvarez-Sabin J (2009) Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1:162-167.
- Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Ribo M, Rubiera M, Alvarez-Sabin J (2004) Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke* 35:486-490.
- Molina CA, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Coscojuela P, Romero F, Codina A (2002) Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 33:1551-1556.
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
- Montagne A, Hebert M, Jullienne A, Lesept F, Le Behot A, Louessard M, Gauberti M, Orset C, Ali C, Agin V, Maubert E, Vivien D (2012) Memantine improves safety of thrombolysis for stroke. *Stroke* 43:2774-2781.
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J (2001) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 32:2762-2767.
- Moos T, Morgan EH (2004) The significance of the mutated divalent metal transporter (DMT1) on iron transport into the Belgrade rat brain. *J Neurochem* 88:233-245.
- Moos T, Rosengren Nielsen T (2006) Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron. *Semin Pediatr Neurol* 13:149-157.
- Moos T, Skjoerringe T, Gosk S, Morgan EH (2006) Brain capillary endothelial cells mediate iron transport into the brain by segregating iron from transferrin without the involvement of divalent metal transporter 1. *J Neurochem* 98:1946-1958.
- Moos T, Rosengren Nielsen T, Skjorringe T, Morgan EH (2007) Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 103:1730-1740.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 39:1291-1304.
- Moser TL, Enghild JJ, Pizzo SV, Stack MS (1993) The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 268:18917-18923.
- Murray CJ et al. (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2197-2223.
- Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1426-1430.
- Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D (1999) Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 99:2440-2444.
- Nandar W, Connor JR (2011) HFE gene variants affect iron in the brain. *J Nutr* 141:729S-739S.

- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, Heyman SN, Higazi AA (2004) In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood* 103:897-902.
- Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA (1992) Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 263:H1356-1362.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-2093.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110:1037-1044.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *NatMed* 7:59-64.
- Nielsen P, Heinelt S, Dullmann J (1993) Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp Biochem Physiol C* 106:429-436.
- Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA (2002) Thrombolytic treatment of clot embolism in rat: comparison of intra-arterial and intravenous application of recombinant tissue plasminogen activator. *Stroke* 33:2999-3005.
- Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA (2003) Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 34:2019-2024.
- NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581-1587.
- Nischwitz V, Berthele A, Michalke B (2008) Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Anal Chim Acta* 627:258-269.
- Norrving B, Kissela B (2013) The global burden of stroke and need for a continuum of care. *Neurology* 80:55-12.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW (2006) 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59:467-477.
- O'Donnell MJ et al. (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376:112-123.
- Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409-417.
- Olmez I, Ozyurt H (2012) Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 60:208-212.
- Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW (1999) A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 341:718-724.

- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D (2007) Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38:2771-2778.
- Ozkan AK, Yemisci OU, Saracgil Cosar SN, Oztop P, Turhan N (2013) Can high-sensitivity C-reactive protein and ferritin predict functional outcome in acute ischemic stroke? A prospective study. *Top Stroke Rehabil* 20:528-536.
- Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, Ageno W, Alberti A, Lanari A, Caso V, Micheli S, Bertolani L, Venti M, Palmerini F, Biagini S, Comi G, Previdi P, Silvestrelli G (2008) Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke* 39:2249-2256.
- Palmer C, Roberts RL, Bero C (1994) Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke* 25:1039-1045.
- Palmer C, Menzies SL, Roberts RL, Pavlick G, Connor JR (1999) Changes in iron histochemistry after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res* 56:60-71.
- Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L (2012) Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51:5705-5724.
- Papanastasiou DA, Vayenas DV, Vassilopoulos A, Repanti M (2000) Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs. *Pathol Res Pract* 196:47-54.
- Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Angles-Cano E, Vivien D (2012) Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 19:1983-1991.
- Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, Strickland S, Iadecola C (2008) Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1073-1078.
- Patt A, Horesh IR, Berger EM, Harken AH, Repine JE (1990) Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg* 25:224-227; discussion 227-228.
- Pawlak R, Strickland S (2002) Tissue plasminogen activator and seizures: a clot-buster's secret life. *J Clin Invest* 109:1529-1531.
- Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S (2005) Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:443-448.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700-704.
- Perez de la Ossa N, Sobrino T, Silva Y, Blanco M, Millan M, Gomis M, Agulla J, Araya P, Reverte S, Serena J, Davalos A (2010) Iron-related brain damage in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41:810-813.
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205.

- Petrak J, Myslivcova D, Man P, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Elleder M, Vulpe CD (2007) Proteomic analysis of hepatic iron overload in mice suggests dysregulation of urea cycle, impairment of fatty acid oxidation, and changes in the methylation cycle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1490-1498.
- Peyssonnaud C, Nizet V, Johnson RS (2008) Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* 7:28-32.
- Pfefferkorn T, Rosenberg GA (2003) Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34:2025-2030.
- Pfeilschifter W, Spitzer D, Czech-Zechmeister B, Steinmetz H, Foerch C (2011) Increased risk of hemorrhagic transformation in ischemic stroke occurring during warfarin anticoagulation: an experimental study in mice. *Stroke* 42:1116-1121.
- Pfeilschifter W, Bohmann F, Baumgarten P, Mittelbronn M, Pfeilschifter J, Lindhoff-Last E, Steinmetz H, Foerch C (2012) Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator under dabigatran anticoagulation in experimental stroke. *Ann Neurol* 71:624-633.
- Pietrangelo A (2010) Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 139:393-408, 408 e391-392.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819.
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 22:146-158.
- Planas AM, Sole S, Justicia C (2001) Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8:834-846.
- Prieto J, Barry M, Sherlock S (1975) Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* 68:525-533.
- Project WM (1988) The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol* 41:105-114.
- Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27:181-186.
- Qi Y, Jamindar TM, Dawson G (1995) Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *J Neurochem* 64:2458-2464.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457.
- Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A (2002) Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 368:471-481.

- Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217.
- Rha JH, Saver JL (2007) The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 38:967-973.
- Rijken DC (1995) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol* 8:291-312.
- Rijken DC, Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 7:4-13.
- Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D (1982) Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* 257:2920-2925.
- Ringelstein EB, Chamorro A, Kaste M, Langhorne P, Leys D, Lyrer P, Thijs V, Thomassen L, Toni D (2013) European Stroke Organisation recommendations to establish a stroke unit and stroke center. *Stroke* 44:828-840.
- Rogers JT, Bush AI, Cho HH, Smith DH, Thomson AM, Friedlich AL, Lahiri DK, Leedman PJ, Huang X, Cahill CM (2008) Iron and the translation of the amyloid precursor protein (APP) and ferritin mRNAs: riboregulation against neural oxidative damage in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 36:1282-1287.
- Ronaldson PT, Davis TP (2012) Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Curr Pharm Des* 18:3624-3644.
- Rosamond W et al. (2008) Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117:e25-146.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008) MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 39:1121-1126.
- Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-291.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29:2189-2195.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG (1995) Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res* 703:151-155.
- Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360-366.
- Rosenthal RE, Chanderbhan R, Marshall G, Fiskum G (1992) Prevention of post-ischemic brain lipid conjugated diene production and neurological injury by hydroxyethyl starch-conjugated deferoxamine. *Free Radic Biol Med* 12:29-33.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rother J (2008) Neuroprotection does not work! *Stroke* 39:523-524.

- Rouault TA (2013) Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14:551-564.
- Rouault TA, Zhang DL, Jeong SY (2009) Brain iron homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab Brain Dis* 24:673-684.
- Rouault TA, Stout CD, Kaptain S, Harford JB, Klausner RD (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell* 64:881-883.
- Russo N, Edwards M, Andrews T, O'Brien M, Bhatia KP (2004) Hereditary haemochromatosis is unlikely to cause movement disorders--a critical review. *J Neurol* 251:849-852.
- Sa-Pereira I, Brites D, Brito MA (2012) Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol* 45:327-347.
- Sacco RL, Chong JY, Prabhakaran S, Elkind MS (2007) Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 369:331-341.
- Saha P, Andia ME, Modarai B, Blume U, Humphries J, Patel AS, Phinikaridou A, Evans CE, Mattock K, Grover SP, Ahmad A, Lyons OT, Attia RQ, Renne T, Premaratne S, Wiethoff AJ, Botnar RM, Schaeffter T, Waltham M, Smith A (2013) Magnetic resonance T1 relaxation time of venous thrombus is determined by iron processing and predicts susceptibility to lysis. *Circulation* 128:729-736.
- Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, Grishin NV, Bruick RK (2009) An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 326:722-726.
- Samson AL, Medcalf RL (2006) Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 50:673-678.
- Sanchez M, Villa M, Ingelmo M, Sanz C, Bruguera M, Ascaso C, Oliva R (2003) Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol* 38:745-750.
- Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Huttemann M (2013) Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol* 47:9-23.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 32:200-219.
- Saqqur M, Tsivgoulis G, Molina CA, Demchuk AM, Siddiqui M, Alvarez-Sabin J, Uchino K, Calleja S, Alexandrov AV (2008) Symptomatic intracerebral hemorrhage and recanalization after IV rt-PA: a multicenter study. *Neurology* 71:1304-1312.
- Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Piontek J, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, de Vries HE (2007) Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J* 21:3666-3676.
- Selim M (2009) Deferoxamine mesylate: a new hope for intracerebral hemorrhage: from bench to clinical trials. *Stroke* 40:590-91.
- Selim MH, Ratan RR (2004) The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev* 3:345-353.

- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122:789-801.
- Shovlin CL, Chamali B, Santhirapala V, Livesey JA, Angus G, Manning R, Laffan MA, Meek J, Tighe HC, Jackson JE (2014) Ischaemic strokes in patients with pulmonary arteriovenous malformations and hereditary hemorrhagic telangiectasia: associations with iron deficiency and platelets. *PLoS One* 9:e88812.
- Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Casperson K, Leibold EA, Connor JR, Georgieff MK (2003) Iron deficiency alters iron regulatory protein and iron transport protein expression in the perinatal rat brain. *Pediatr Res* 53:800-807.
- Siesjo BK (1988) Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol* 9:31-88.
- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169-184.
- Sims NR, Pulsinelli WA (1987) Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurochem* 49:1367-1374.
- Singh N, Haldar S, Tripathi AK, Horback K, Wong J, Sharma D, Beserra A, Suda S, Anbalagan C, Dev S, Mukhopadhyay CK, Singh A (2013) Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms To Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*.
- Sobrado M, Delgado M, Fernandez-Valle E, Garcia-Garcia L, Torres M, Sanchez-Prieto J, Vivancos J, Manzanares R, Moro MA, Pozo MA, Lizasoain I (2011) Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage* 57:45-54.
- Soloniuk DS, Perkins E, Wilson JR (1992) Use of allopurinol and deferoxamine in cellular protection during ischemia. *Surg Neurol* 38:110-113.
- Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N (2004) Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 300:202-212.
- Song KS, Kim HK, Shim W, Jee SH (2001) Plasma fibronectin levels in ischemic heart disease. *Atherosclerosis* 154:449-453.
- Sousa RM, Ferri CP, Acosta D, Albanese E, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, Jotheeswaran AT, Rodriguez JJ, Pichardo GR, Rodriguez MC, Salas A, Sosa AL, Williams J, Zuniga T, Prince M (2009) Contribution of chronic diseases to disability in elderly people in countries with low and middle incomes: a 10/66 Dementia Research Group population-based survey. *Lancet* 374:1821-1830.
- STAIR (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30:2752-2758.
- STAIR (2001) Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke* 32:1598-1606.
- Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV (2003) Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* 116:4615-4628.

- Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:593-606.
- Steiner T, Bluhmki E, Kaste M, Toni D, Trouillas P, von Kummer R, Hacke W (1998) The ECASS 3-hour cohort. Secondary analysis of ECASS data by time stratification. ECASS Study Group. European Cooperative Acute Stroke Study. *Cerebrovasc Dis* 8:198-203.
- Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Kovanen PT, Tatlisumak T, Lindsberg PJ (2007) Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation* 116:411-418.
- Strickland S (2001) Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb Haemost* 86:138-143.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA (2008) Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 14:731-737.
- Sumii T, Lo EH (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33:831-836.
- Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C (2012) Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* 7:407-418.
- Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K (2009) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 114:3352-3358.
- Tabrizi P, Wang L, Seeds N, McComb JG, Yamada S, Griffin JH, Carmeliet P, Weiss MH, Zlokovic BV (1999) Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model: studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2801-2806.
- Tai SH, Chen HY, Lee EJ, Chen TY, Lin HW, Hung YC, Huang SY, Chen YH, Lee WT, Wu TS (2010) Melatonin inhibits postischemic matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation via dual modulation of plasminogen/plasmin system and endogenous MMP inhibitor in mice subjected to transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res* 49:332-341.
- Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
- Terent A, Asplund K, Farahmand B, Henriksson KM, Norrving B, Stegmayr B, Wester PO, Asberg KH, Asberg S (2009) Stroke unit care revisited: who benefits the most? A cohort study of 105,043 patients in Riks-Stroke, the Swedish Stroke Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:881-887.
- Terruso V, D'Amelio M, Di Benedetto N, Lupo I, Saia V, Famoso G, Mazzola MA, Aridon P, Sarno C, Ragonese P, Savettieri G (2009) Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *Neuroepidemiology* 33:261-265.

- Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S (1996) Neuronal cell death and tPA. *Nature* 384:123-124.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377:340-344.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH (2005) Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* 36:1954-1959.
- Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti SV, Torti FM (2000) Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 20:5818-5827.
- Turner RC, Dodson SC, Rosen CL, Huber JD (2013) The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success. *J Neurosurg* 118:1072-1085.
- Van der Goes A, Wouters D, Van Der Pol SM, Huizinga R, Ronken E, Adamson P, Greenwood J, Dijkstra CD, De Vries HE (2001) Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro. *FASEB J* 15:1852-1854.
- van der Worp HB, Thomas CE, Kappelle LJ, Hoffman WP, de Wildt DJ, Bar PR (1999) Inhibition of iron-dependent and ischemia-induced brain damage by the alpha-tocopherol analogue MDL 74,722. *Exp Neurol* 155:103-108.
- Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, Bhaskaran N, Persson A, Uhlen M, Sangfelt O, Spruck C, Leibold EA, Wohlschlegel JA (2009) Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* 326:718-721.
- von Kummer R, Hacke W (1992) Safety and efficacy of intravenous tissue plasminogen activator and heparin in acute middle cerebral artery stroke. *Stroke* 23:646-652.
- Wakisaka Y, Chu Y, Miller JD, Rosenberg GA, Heistad DD (2010) Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:56-69.
- Wang J, Pantopoulos K (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434:365-381.
- Wang X, Lo EH (2003) Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 28:229-244.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ (1995) Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 26:661-665; discussion 665-666.
- Wang X, Siren AL, Liu Y, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 26:61-68.
- Wang X, Lee SR, Arai K, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *NatMed* 9:1313-1317.

- Wang X, Tsuji K, Lee SR, Ning M, Furie KL, Buchan AM, Lo EH (2004) Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke* 35:2726-2730.
- Wang X, Fan X, Yu Z, Liao Z, Zhao J, Mandeville E, Guo S, Lo EH (2014) Effects of tissue plasminogen activator and annexin A2 combination therapy on long-term neurological outcomes of rat focal embolic stroke. *Stroke* 45:619-622.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4:228-231.
- Watanabe N, Ikeda U (2004) Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 6:112-120.
- Weber C, Fraemohs L, Dejana E (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467-477.
- Weiss G (2005) Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:183-201.
- Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4:278-286.
- Won SM, Lee JH, Park UJ, Gwag J, Gwag BJ, Lee YB (2011) Iron mediates endothelial cell damage and blood-brain barrier opening in the hippocampus after transient forebrain ischemia in rats. *Exp Mol Med* 43:121-128.
- Woodfin A, Hu DE, Sarker M, Kurokawa T, Fraser P (2011) Acute NADPH oxidase activation potentiates cerebrovascular permeability response to bradykinin in ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 50:518-524.
- Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Medcalf RL, Yepes M (2012) Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* 32:9848-9858.
- Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, Meyron-Holtz E, Smith S, Land W, Tsai RY, Berger UV, Sheng ZH, Rouault TA (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* 1001:108-117.
- Xi G, Reiser G, Keep RF (2003) The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem* 84:3-9.
- Yamaguchi S, Yamakawa T, Niimi H (2000) Microcirculatory responses to repeated embolism-reperfusion in cerebral microvessels of cat: a fluorescence videomicroscopic study. *Clin Hemorheol Microcirc* 23:313-319.
- Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T (2008) Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol* 172:521-533.
- Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K (1997) Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 762:240-242.
- Yang Y, Rosenberg GA (2011) Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke* 42:3323-3328.

- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:697-709.
- Yepes M, Lawrence DA (2004) New functions for an old enzyme: nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp Biol Med* (Maywood) 229:1097-1104.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112:1533-1540.
- Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemuganti R (2007) Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int* 50:1014-1027.
- Young AR, Ali C, Duretete A, Vivien D (2007) Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *JNeurochem* 103:1302-1309.
- Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, Swaan PW (2002a) Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab Rev* 34:709-750.
- Zhang L, Zhang ZG, Chopp M (2012) The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol Sci* 33:415-422.
- Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniago P, Li Q, Lu M, Chopp M (2002b) A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 117:207-214.
- Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, Jiang Q, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang RL, Lu M, Chopp M (2005) Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation* 112:3486-3494.
- Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M (1999) Increased therapeutic efficacy with rt-PA and anti-CD18 antibody treatment of stroke in the rat. *Neurology* 52:273-279.
- Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR (1997a) A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res* 766:83-92.
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP (1993) Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:378-388.
- Zhang Z, Chopp M, Zhang RL, Goussev A (1997b) A mouse model of embolic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1081-1088.
- Zhao BQ, Tejima E, Lo EH (2007) Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke* 38:748-752.
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* 12:441-445.
- Zheng L, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H, Zalkin H (1992) Binding of cytosolic aconitase to the iron responsive element of porcine mitochondrial aconitase mRNA. *Arch Biochem Biophys* 299:356-360.

- Zimmer M, Ebert BL, Neil C, Brenner K, Papaioannou I, Melas A, Tolliday N, Lamb J, Pantopoulos K, Golub T, Iliopoulos O (2008) Small-molecule inhibitors of HIF-2 α translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell* 32:838-848.
- Zlokovic BV (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:202-208.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.



PUBLICACIONES

A Mouse Model of Hemorrhagic Transformation by Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration After In Situ Thromboembolic Stroke

Isaac García-Yébenes, BSc; Mónica Sobrado, PhD; Juan G. Zarruk, MD; Mar Castellanos, MD, PhD; Natalia Pérez de la Ossa, MD; Antoni Dávalos, MD, PhD; Joaquín Serena, MD, PhD; Ignacio Lizasoain, MD, PhD; María A. Moro, PhD

Background and Purpose—Thrombolytic treatment with tissue plasminogen activator (tPA) improves outcome of patients with stroke who can be treated within 3 hours of symptom onset. However, delayed treatment with tPA leads to increased risk of hemorrhagic transformation and can result in enhanced brain injury. The purpose of this study is to validate a reproducible mouse model of hemorrhagic transformation associated with delayed administration of tPA.

Methods—Mice were anesthetized and thrombin was injected into the middle cerebral artery to induce the formation of a clot as described by Orset et al. To induce reperfusion, tPA (10 mg/kg) was intravenously administered 20 minutes or 3 hours after thrombin injection.

Results—Thrombin produced a clot in 83.1% of the animals, which caused focal ischemia determined 24 hours after the injection. Different degrees of bleeding were found in the middle cerebral artery occlusion group, including hemorrhagic infarction type 1 (HI-1) in 46.2%, hemorrhagic infarction type 2 (HI-2) in 30.8% and parenchymal hemorrhage type 1 in 23.0%. Administration of tPA 20 minutes after the occlusion produced an effective reperfusion in 62.5% of the animals and reduced both infarct volume and appearance of severe hemorrhage (10% nonhemorrhage, 80% HI-1 and 10% HI-2). However, administration of tPA 3 hours after the occlusion led to effective reperfusion in 47.1% of the animals, did not reduce infarct volume, caused hemorrhagic transformation (25% HI-1, 37.5% HI-2, and 37.5% parenchymal hemorrhage type 1), and increased hemorrhage and brain swelling.

Conclusions—We have set up a reproducible mouse model of hemorrhagic transformation associated with delayed administration of tPA similar to that observed in humans. (*Stroke*. 2011;42:196-203.)

Key Words: blood–brain barrier ■ brain swelling ■ clot ■ edema ■ thrombin

Thrombolytic treatment with tissue plasminogen activator (tPA) is the main approved therapy that improves outcome in patients with acute ischemic stroke. Unfortunately, the therapeutic window is only 3 hours from symptom onset.¹ Some studies have suggested that there may still be patients able to benefit from thrombolysis even beyond 4.5 hours using the “mismatch” imaging concept.^{2,3} However, recent studies^{4,5} did not confirm those results, supporting the concept that delayed treatment with tPA is associated with an increased risk of blood–brain barrier breakdown, edema, and hemorrhagic transformation (HT), which can result in enhanced brain injury. Due to these complications together with the narrow therapeutic window, only a small percentage of patients with ischemic stroke (<5%) benefit from tPA-induced thrombolysis. Therefore, it becomes urgent to investigate mechanisms underlying risk of reperfusion injury not

only to improve safety of tPA, but also to search for alternatives to this treatment.

Experimental models of stroke present several problems, even more evident when the model aims to emulate HT. In this context, most authors have used either normal or spontaneous hypertensive rats in which the occlusion is performed by using an intraluminal filament,^{6,7} injection of blood clots,⁸ or in situ clot formation by using rose Bengal.⁹ First, there are numerous differences in cerebral pathophysiology and reperfusion injury when mechanical and embolic clot-based models are compared. In addition, although clot-based models are closer to what happens in patients, a limitation is the lack of reproducibility and uniformity in the size and location of the infarcts, because placement and ultimate lodgement of the multiple emboli are not controlled. In addition, photochemically induced emboli are platelet-rich and lack fibrin and,

Received August 19, 2010; final revision received September 15, 2010; accepted September 16, 2010.

From the Departamento de Farmacología (I.G.-Y., M.S., J.G.Z., I.L., M.A.M.), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; Departamento de Neurociencias (I.G.-Y., N.P.d.l.O., A.D.), Hospital Germans Trias i Pujol, Universidad Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and Servicio de Neurología, Hospital Dr Josep Trueta (M.C., J.S.), IdIBGi, Girona, Spain.

The online-only Data Supplement is available at <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/STROKEAHA.110.600452/DC1>.

Correspondence to Ignacio Lizasoain, MD, PhD, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid, 28040, Madrid, Spain. E-mail ignacio.lizasoain@med.ucm.es

© 2010 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.600452

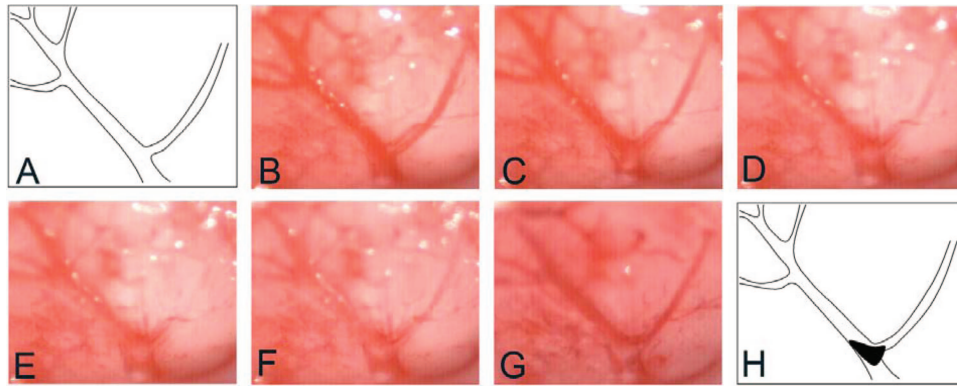


Figure 1. Occlusion of the MCA. After the craniotomy, the MCA, a bright red color, is exposed (A–B) and thrombin is injected in the bifurcation with a micropipette (C). During the injection, the artery increasingly turns white (D–F). After the injection, the branches of the MCA go dark red due to the arrested blood flow, and a white clot becomes apparent in its bifurcation (G–H).

therefore, are not accessible to thrombolysis with tPA (for review, see Willing¹⁰).

Recently, a mouse model based on an in situ thromboembolic occlusion of the middle cerebral artery (MCA) was described, which allows recanalization and improves stroke outcome after early administration of tPA.¹¹ Using this approach, the purpose of this study is to establish a reproducible mouse model of HT associated with delayed administration of tPA.

Materials and Methods

General

Adult male Swiss (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) mice weighing 25 to 35 g were used in this study. Experimental ischemia was carried out as described.¹¹ Mice were anesthetized and mouse α -thrombin (2 UI) was injected into the MCA to induce a clot (Figure 1). A clot was defined as stable when laser Doppler flowmetry displayed a drastic fall of brain perfusion that remained stable during 60 minutes (mean reduction of 70% to 80%) and that was accompanied by a change in the color of the artery.

For reperfusion, tPA (10 mg/kg) was intravenously administered 20 minutes or 3 hours after thrombin injection. We defined a reperfusion as effective when blood flow was recovered (in the range of 60% to 100% of basal values) and remained stable within the first 60 minutes after tPA injection.

Details consistent with good laboratory practice, methods, etc, are provided in the Supplemental Data (which includes an addition to the “Methods” section, a Table, and a Figure; available at <http://stroke.ahajournals.org>).

Experimental Groups and Exclusion Criteria

Animals were classified in 5 different groups: (1) MCA occlusion (MCAO), in which vehicle was intravenously administered 20 minutes or 3 hours after thrombin injection; and (2 and 3) MCAO+tPA–20 minutes and MCAO+tPA–3 hours, in which tPA was intravenously administered 20 minutes or 3 hours, respectively, after thrombin injection; (4) spontaneous-reperfusion, a group of mice in which perfusion was transiently arrested but spontaneously returned to basal values in the absence of tPA within 60 minutes after thrombin injection; and (5) no-reperfusion, a group of mice that did not present reperfusion after tPA injection. Additional details regarding exclusion criteria, methods for allocation to treatment group, etc, are provided in Figure 2 and Supplemental Data.

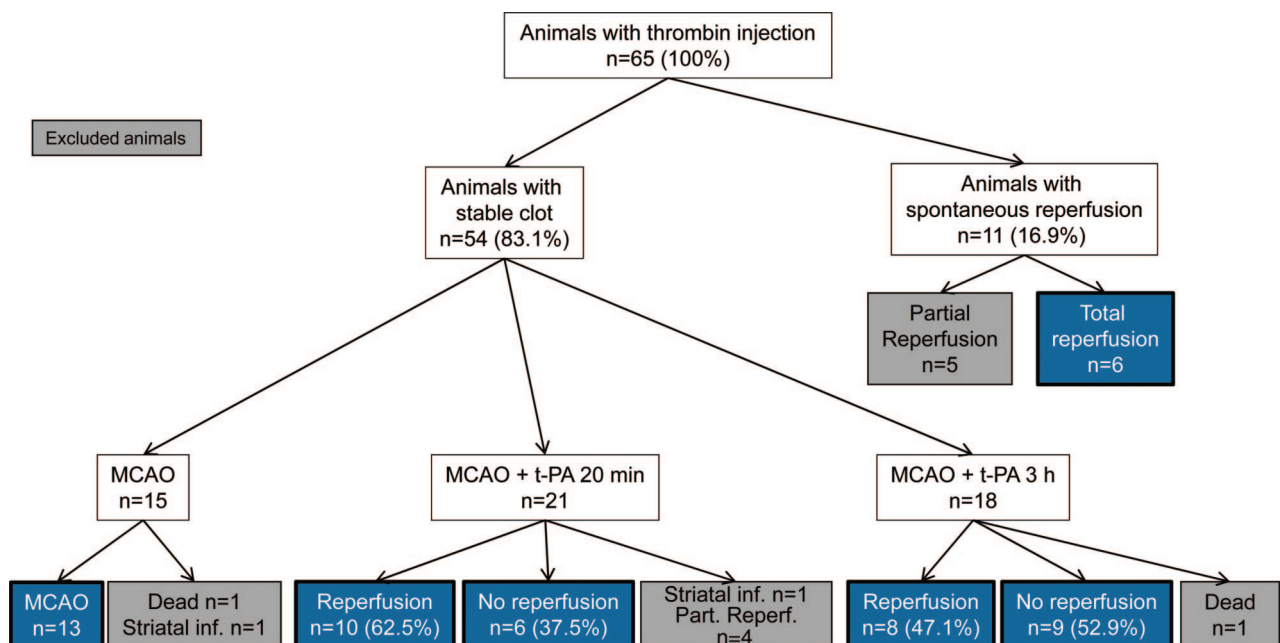


Figure 2. Flow chart of the study. Inf. indicates infarction; Part. Reperf., partial reperfusion.

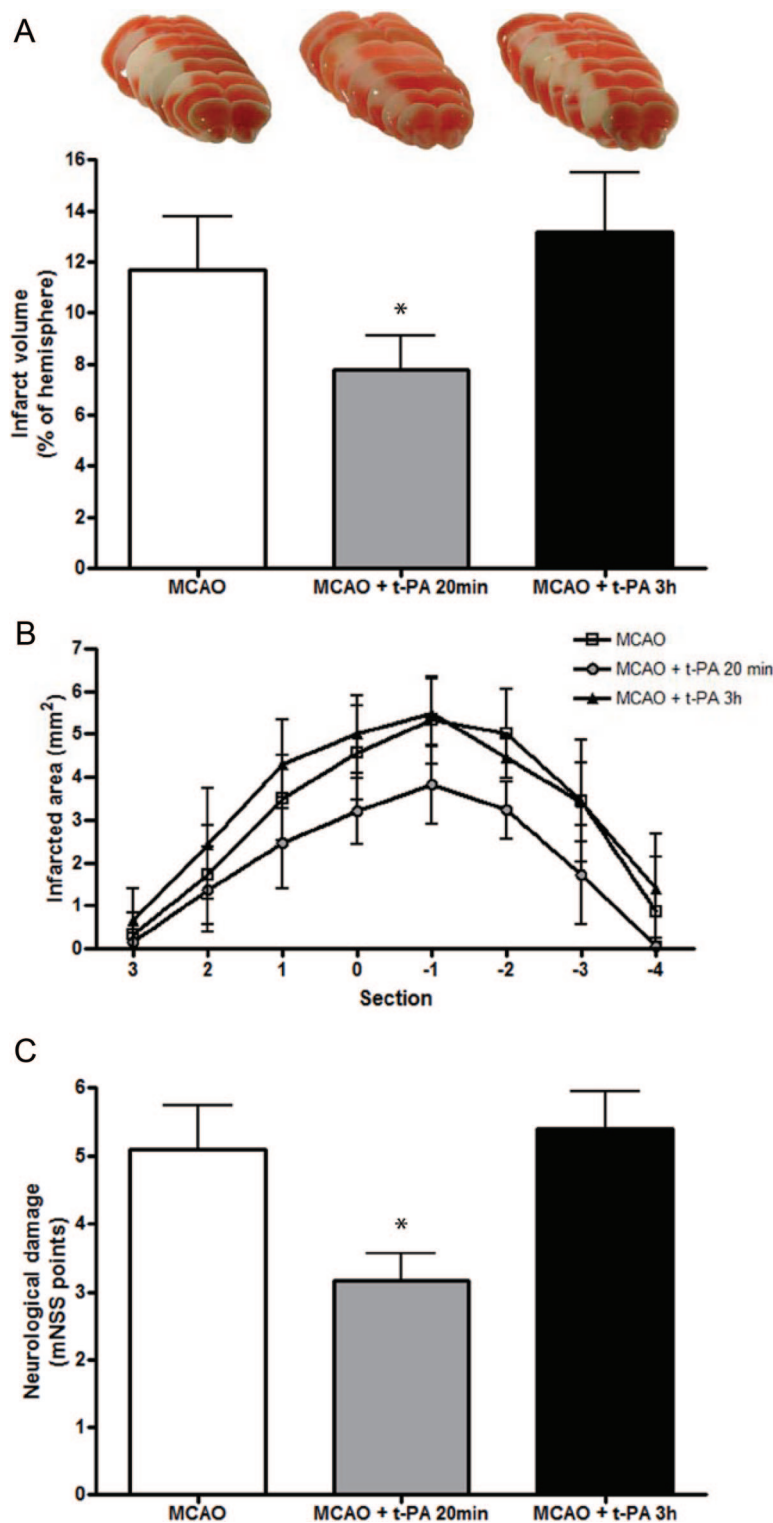


Figure 3. Effect of early or late administration of tPA on infarct outcome. Infarct volume (A), areas (B), and neurological deficit (C) were determined 24 hours after ischemic insult in MCAO, MCAO+tPA-20 minutes, and MCAO+tPA-3 hours groups. Data are mean \pm SD; n=6 to 15; * P <0.05 versus MCAO group. Photographs of brain slices from representative experiments.

Outcome Measures

Neurological deficit was assessed by using a modified neurological severity score and infarct size and brain swelling were determined as described in the Supplemental Data.

Assessment of HT

Hemorrhages were macroscopically classified in 5 groups: (1) nonhemorrhage; (2) hemorrhagic infarction type 1 (HI-1), defined as small petechiae, generally along the boundary of the infarct; (3)

hemorrhagic infarction type 2 (HI-2), with more confluent petechiae within the damaged area; (4) parenchymal hemorrhage type 1 (PH-1), characterized by blood clots in <30% of the injured parenchyma; and (5) parenchymal hemorrhage type 2 (PH-2) with clots in >30% of the infarct. Additional histological examination was performed after Nissl and diaminobenzidine staining. Hemorrhage was also quantified by area measurement on images of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride-stained sections and by a spectrophotometric assay (details and references consistent with

Table 1. Summary of the Results

| | MCAO | MCAO+tPA-20 Minutes | MCAO+tPA-3 Hours | Spontaneous Reperfusion | No Reperfusion |
|-----------------------------------|-----------|------------------------|---------------------|----------------------------|----------------|
| Infarct volume, % | 11.7±2.0 | 7.8±1.3 | 13.2±2.3 | 6.6±3.6 | 11.8±3.0 |
| Neurological deficit, points | 5.1±0.6 | 3.2±0.4 | 5.4±0.5 | 3.3±0.3 | 5.2±1.3 |
| Edema, % | 1.9±2.3 | 2.6±2.2 | 6.1±2.0 | 1.9±0.9 | 2.0±3.1 |
| Hemorrhagic area, mm ² | 0.44±0.47 | 0.18±0.1 | 1.80±2.2 | 0.11±0.06 | 1.10±1.1 |
| Blood volume, nL | 5.5±13.5 | 0±0 | 30.1±38.6 | 4±5.6 | 29.2±46.4 |

HT and statistical analysis are provided in the Supplemental Data).

Results

Effect of tPA on Infarct Volume Caused by Thrombin Injection

Injection of thrombin into the MCA generated a clot as previously described,¹¹ which induced an infarct (MCAO, infarct volume of 11.7%±2.0%, n=13; Figure 3A–B; Table 1) and neurological damage 24 hours after the injection (n=6; Figure 3C; Table 1). A thrombin-induced stable clot was formed in 83.1% (Figure 2) of the animals associated with a rapid and sustained reduction of brain perfusion during 60 minutes (mean reduction of 70% to 80%; Figure 4A).

Administration of tPA 20 minutes after thrombin injection was associated with higher incidence of vessel recanalization, reduction in infarct volume (MCAO+tPA-20 minutes, 33% of reduction; n=10; $P<0.05$ versus MCAO; Figure 3A–B;

Table 1), and better functional outcome 24 hours after MCAO (n=6, $P<0.05$; Figure 3C; Table 1). Early treatment with tPA led to an effective reperfusion, as shown by a recovery of initial cerebral blood flow, which remained stable within the first 60 minutes after tPA injection (Figure 4B), in 62.5% of the animals (Figure 2).

Administration of tPA 3 hours after clot formation led to effective reperfusion (the blood flow returned to basal levels and remained stable during the first 60 minutes after tPA injection; Figure 4C) in 47.1% of the animals (Figure 2). However, it did not affect infarct volume (MCAO+tPA-3 hours, n=8; $P>0.05$ versus MCAO; Figure 3A–B; Table 1) or functional outcome 24 hours after MCAO (n=5, $P>0.05$; Figure 3C; Table 1).

A group of mice (16.9% of the animals) showed spontaneous reperfusion (Figures 2 and 4D). The infarct size in this group was similar to that found in the MCAO+tPA-20 minutes group (spontaneous-reperfusion, n=6; $P>0.05$ ver-

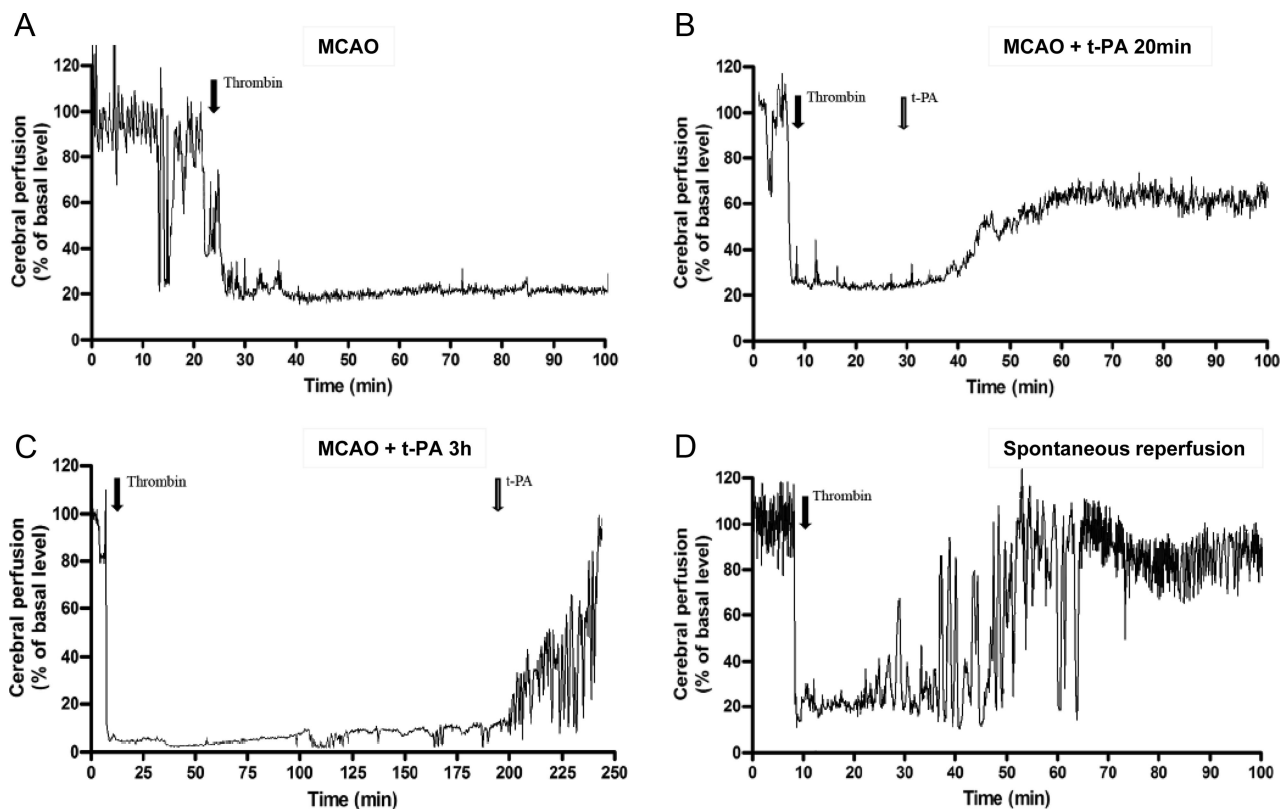


Figure 4. Effect of early or late administration of tPA on cerebral blood flow. Representative cerebral blood flow tracings of MCAO (A), MCAO+tPA-20 minutes (B), MCAO+tPA-3 hours (C), and spontaneous-reperfusion groups (D) as measured by laser Doppler flowmetry. Cerebral blood flow is expressed as percent of basal level.

Table 2. Physiological Parameters*

| | Preischemic 0 Minutes | Ischemic Period | | | Reperfusion Period (tPA) | |
|------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|--|
| | | 15 Minutes After Thrombin | 80 Minutes After Thrombin | 240 Minutes After Thrombin | 80 Minutes After Thrombin (tPA at 20 Minutes) | 240 Minutes After Thrombin (tPA at 3 Hours) |
| pH | 7.33±0.06 | 7.28±0.04 | 7.32±0.05 | 7.09±0.17 | 7.30±0.08 | 7.12±0.08 |
| pCO ₂ | 32.2±8.74 | 37.7±9.48 | 32.0±7.83 | 49.0±17.72 | 30.1±15.14 | 32.5±5.22 |
| pO ₂ | 186±15.77 | 168.3±36.09 | 196.3±33.5 | 185.3±0.5 | 193.0±22.6 | 198.3±12.2 |
| Ht | 37.7±1.7 | 36.6±2.0 | 35.3±0.8 | 37.3±4.7 | 34.3±3.2 | 36.6±7.7 |
| Hb | 12.8±0.6 | 12.4±0.7 | 11.9±0.2 | 12.7±1.5 | 11.7±1.0 | 12.5±2.5 |
| MABP | 73.6±5.2 | 68.1±7.8 | 67.3±13.1 | 43.4±3.5 | 53.2±4.7 | 42.2±2.6 |

*Parameters were measured in mice before and after tPA administration.

Values are mean±SD (n=4).

MABP indicates mean arterial blood pressure; Ht, hematocrit; Hb, hemoglobin.

sus MCAO+tPA–20 minutes; Table 1). The neurological damage was also similar (n=4, $P>0.05$ versus MCAO+tPA–20 minutes; Table 1).

Finally, a group of mice without reperfusion was found in 45.5% of the animals treated with tPA (Figure 2). In this case, the infarct size was similar to that found in the MCAO group (no-reperfusion, n=15; $P>0.05$ versus MCAO; Table 1). The neurological damage was also similar (n=5, $P>0.05$ versus MCAO; Table 1). In any case, all the animals from this group had the MCA recanalized when the wound was reopened 24 hours after MCAO and before euthanasia.

Physiological parameters were not significantly different among the groups studied, apart from some degree of hypotension at 240 minutes after occlusion, which was previously described and was independent of tPA administration (Table 2).^{12,13} The values of activated partial thromboplastin time, as indicator of coagulation pathway, were not significantly different between control animals and after tPA administration (ratios of activated partial thromboplastin time: 0.93 ± 0.22 versus 2.18 ± 1.50 , respectively, n=4 to 7, $P>0.05$).

Effect of tPA on Hemorrhage and Brain Swelling

Mild signs of bleeding were found in all the animals from the MCAO group when measured 24 hours after thrombin injection in both macroscopic or histological examinations (Figures 5 and 6A, D, respectively). HI-1 was present in

46.2%, HI-2 in 30.8%, and PH-1 in 23.0% of the animals. No PH-2 was found in this group (Figure 5).

Administration of tPA 20 minutes after clot formation (MCAO+tPA–20 minutes group) significantly decreased HI-2 percentage at the same time as increasing the HI-1 fraction when compared with the MCAO group ($P<0.05$ versus MCAO; Figure 5). However, the mean hemorrhage area was similar to that found in the MCAO group (n=10, $P>0.05$ versus MCAO, Figure 7A; Table 1) and the blood volume was undetectable (n=6, $P>0.05$ versus MCAO, Figure 7B; Table 1). Mild signs of bleeding were also observed by histological examination (Figure 6B, E).

Interestingly, administration of tPA 3 hours after clot formation (MCAO+tPA–3 hours group) increased the occurrence of PH-1 and HI-2, reducing the percentage of HI-1 (Figure 5). Furthermore, delayed administration of tPA increased hemorrhage area (n=8, $P<0.05$ versus MCAO and MCAO+tPA–20 minutes), blood volume (n=5, $P<0.05$ versus MCAO+tPA–20 minutes; Figure 7A–B; Table 1), brain swelling (n=8, $P<0.05$ versus MCAO and MCAO+tPA–20 minutes; Figure 7C; Table 1), and blood extravasation (Figure 6C, F).

The spontaneous-reperfusion group showed percentages of bleeding similar to those found in the MCAO+tPA–20 minutes group (20% nonhemorrhage, 80% HI-1; n=5, $P>0.05$ versus MCAO+tPA–20 minutes). The mean values of hemorrhage area (n=5, $P>0.05$ versus MCAO+tPA–20

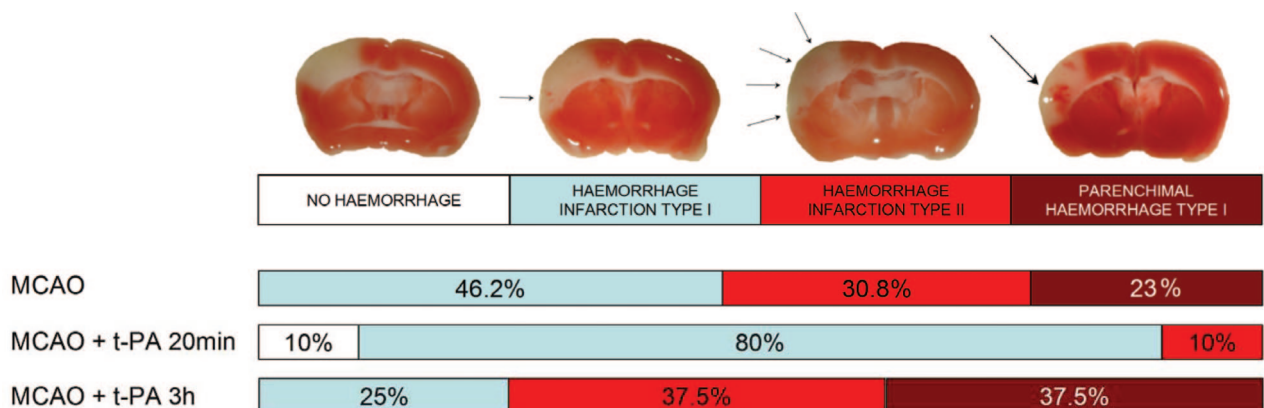


Figure 5. Effect of early or late administration of tPA on macroscopic hemorrhages. Hemorrhages were classified by type and extension in 4 groups: (1) no-hemorrhage; (2) HI-1; (3) HI-2; and (4) PH-1. Data are expressed as percent of animals showing signs of bleeding. Each animal was assigned to 1 group according to the most severe bleeding.

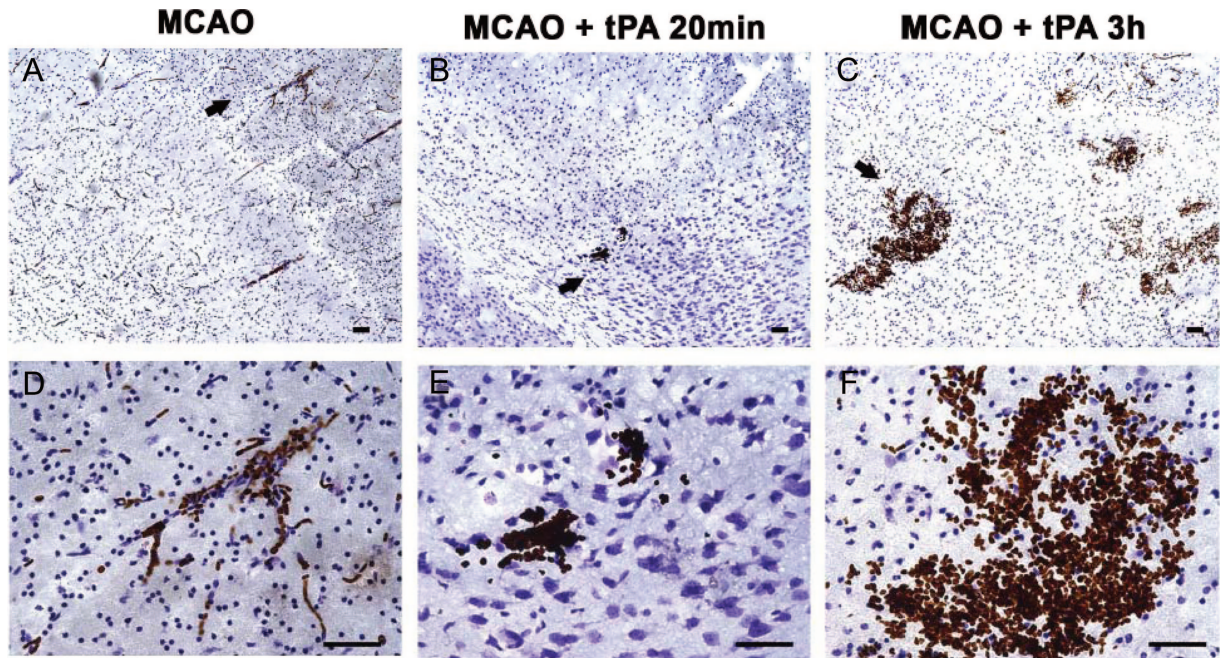


Figure 6. Effect of early or late administration of tPA on hemorrhage. Representative Nissl combined with diaminobenzidine staining of brain sections from MCAO (A, D), MCAO+tPA–20 minutes (B, E), and MCAO+tPA–3 hours groups (C, F). Scale bars, 25 μ m.

minutes; Table 1) and blood volume ($n=4$, $P>0.05$ versus MCAO+tPA–20 minutes; Table 1) were also similar to the early tPA reperfused group. In contrast, the no-reperfusion group showed values similar to the MCAO group (42.9% HI-1, 21.4% HI-2, 35.7% PH-1, $n=14$, $P>0.05$ versus MCAO; hemorrhage area of 1.1 ± 1.1 mm², $n=14$, $P>0.05$ versus MCAO; blood volume of 29 ± 46 nL/hemisphere, $n=7$, $P>0.05$ versus MCAO; Table 1). Moreover, all animals of this group had the vessel reperfused 24 hours after surgery.

Discussion

So far, tPA is the main approved treatment for acute ischemic stroke treatment but with a very narrow therapeutic window due in part to the risk of HT and decreased efficacy beyond 3 hours. We hereby describe a model of HT caused by delayed tPA administration in an in situ thromboembolic stroke model in mice. Its features, resembling human clinic, suggest that this model may be very useful for the study of the mechanisms underlying this severe complication and to investigate new targets to improve stroke treatment.

Recently, Orset et al¹¹ described a useful stroke model based on in situ clot formation with several advantages such as its similarity to the human clinical situation with involvement of the whole neurovascular unit, the possibility to undergo reperfusion in response to early treatment with tPA, and its relatively good reproducibility. Therefore, this model appeared very suitable for the study of HT, that is, the bleeding into an area with pre-existing ischemic tissue damage,¹⁴ which often results as an adverse effect of thrombolytic therapy. For that, we assayed the effect of the intravenous administration of tPA at 20 minutes and 3 hours after occlusion.

First of all, we have found that thrombin-induced MCAO (MCAO group) caused a rapid fall in cerebral blood flow rate associated with the formation of a clot at the injection site. This

clot was stable for at least the 60-minute duration of Doppler flow-rate recording and was associated 24 hours later with the appearance of an infarcted region in brain cortex, concomitant to a neurological deficit. The infarct volume showed good reproducibility within the territory supplied by the MCA. In this condition, brain tissue also showed modest values of hemorrhage area and blood volume. Of note, although this condition was associated in approximately half of the animals studied with benign, hardly noticeable bleeding¹⁵ (classified as HI-1), the other half showed either mild bleeding, classified as HI-2, or even PH-1. In addition, intravascular thrombin injection did not produce any detectable side effects, as previously described,¹⁶ likely due to its in vivo short half-life¹⁷ and to the dose used in this study.

In agreement with Orset et al,¹¹ administration of tPA 20 minutes after thrombin-induced occlusion (MCAO+tPA–20 minutes) induced recovery of cerebral blood flow rate up to 60% of initial values at least 10 minutes after the infusion onset and a better stroke outcome as shown by reduced infarct volume and better neurological scores. In addition, there was a reduction in both blood volume and hemorrhage area when compared with the MCAO group. More importantly, brain tissues showed just benign bleeding (HI-1, 80%) or even no bleeding at all (10%) with just 10% of HI-2. These data indicate that early vessel recanalization is able to rescue still viable ischemic brain tissue despite the appearance of some petechial bleeding. This might explain evidence from the clinical practice that has demonstrated that early thrombolytic treatment improves stroke outcome^{1,18,19} and that HI is mostly associated with neurological improvement and recanalization in patients receiving tPA.^{20,21} Although Orset et al¹¹ could not detect any evidence of hemorrhage, a discrepancy that might arise from the use of different assessment methods among other reasons, our results are basically in agreement with

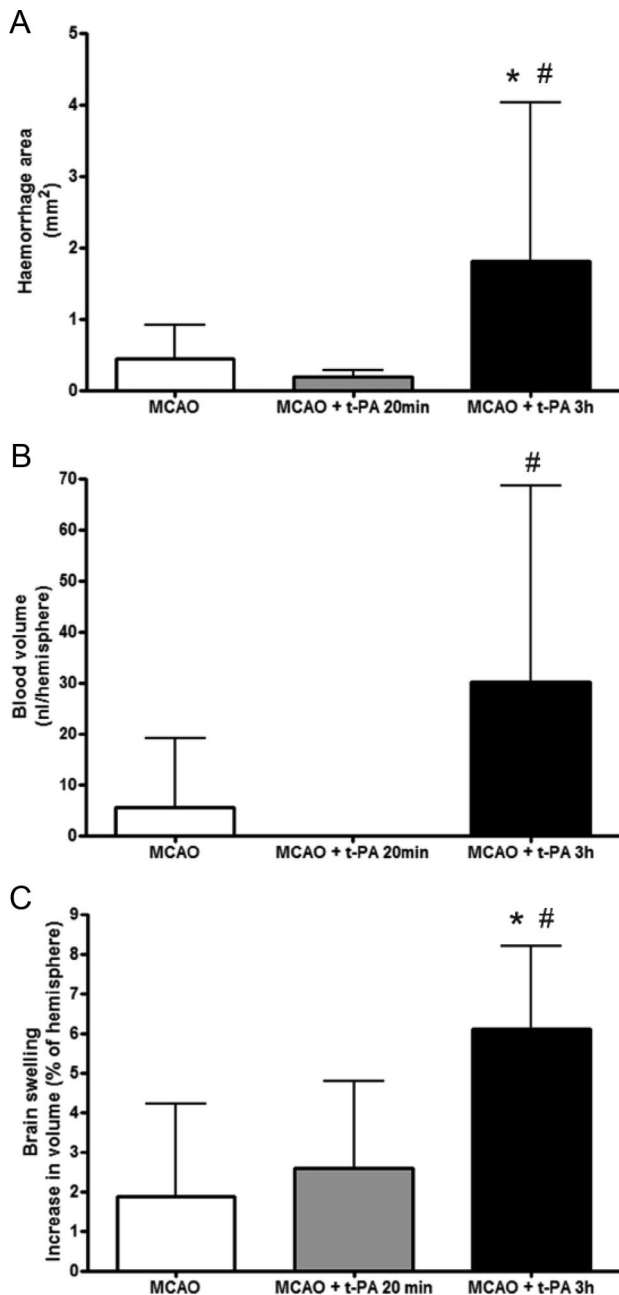


Figure 7. Effect of early or late administration of tPA on hemorrhage area and brain swelling. Hemorrhage area (A), blood volume (B), and brain swelling (C) were determined 24 hours after ischemic insult in MCAO, MCAO+tPA-20 minutes, and MCAO+tPA-3 hours groups. Data are mean \pm SD; n=6 to 15; * P <0.05 versus MCAO and # P <0.05 versus MCAO+tPA-20 minutes group.

theirs, being now our major finding the difference between early and delayed administration of tPA.

Indeed, we have now found that delayed tPA administration (MCAO+tPA-3 hours) exhibits remarkable differences with its early counterpart; although tPA was effective in recovering cerebral perfusion, infarct outcome was not affected by this treatment, because both infarct volume and neurological scores were not significantly different from the MCAO group. However, especially noteworthy was the finding of a remarkable increase in both hemorrhage area and

blood volume in the brain tissue of these mice. Accordingly, only one fourth of the animals treated showed benign bleeding (HI-1); this treatment was associated in the rest of the individuals with either HI-2 or to PH-1, indicating that delayed tPA causes HT of the ischemic infarct in this model. Furthermore, we have found that administration of tPA at 3 hours produces brain swelling indicating brain edema, in agreement with the concept that delayed administration of tPA can disrupt the blood-brain barrier.²² The development of HT after delayed tPA treatment found in our model is consistent with previous studies in other experimental models.^{14,23–27} In contrast with our model in mice, the therapeutic window for tPA in humans might be longer in some cases (4.5 hours).¹ Several reasons may account for this, but very likely it is due to a faster metabolism in mice.

Interestingly, we have found that some animals (16.9%) underwent spontaneous reperfusion after thrombin injection, which could be followed by both recovery in cerebral perfusion and by visualization of the recanalization. In these cases, both infarct volume and bleeding were very close to those found in the early-reperfused group. In addition, we also found a set of tPA-treated animals (45.5%) that did not experience reperfusion regardless of treatment with tPA. It is worth highlighting that these 2 situations resemble the clinical situation,²⁸ thus identifying our model as one of the most adequate ones for the study of the adverse effects of thrombolytic treatments.

Our model presents important advantages; it provides a reproducible and predictable infarct volume within the territory supplied by the MCA, it has a low mortality rate, and it resembles the findings in human patients, in which the longer the administration of tPA, the more frequent and severe the bleeding.^{28,29} Another positive feature is that the model has been developed in mice, thus facilitating studies of pathophysiological mechanisms using animals with genetic manipulations. For all these reasons, this model appears very suitable for the study of HT after delayed tPA.

Despite all this, our model presents some limitations: (1) clot is induced by a direct thrombin injection; although we have not detected any remarkable effect of this treatment, we cannot discard that some biochemical parameters might be affected by this protease, especially those implicated in edema^{30,31} and apoptosis or cell damage^{32,33}; (2) in line with the previous issue, the clot induced by thrombin is a fibrin-rich embolus that contains a low number of cells and platelets¹¹; this indicates that the model is suitable for the study of thrombolytic treatment after ischemic infarcts of a cardioembolic nature, but further studies are required to ascertain its validity as a model in the case of atherothrombotic infarct types; and (3) the delayed administration has been set at 3 hours after the ischemic occlusion; however, this is still a safe time when it translates to humans, very likely due to species differences.

Conclusion

We have set up a reproducible mouse model of HT associated with delayed administration of tPA, similar to that noted in humans. This method may be useful for the study of risk of reperfusion injury and to improve the safety and efficacy of thrombolytic therapy.

Acknowledgments

We thank Prof Eng H. Lo for his insightful discussion of the manuscript.

Sources of Funding

This work was supported by grants from Spanish Ministry of Science and Innovation SAF2009-08145 (M.A.M.) and SAF2008-03122 (I.L.) and the Spanish Ministry of Health RENEVAS RD06/0026/0005 (M.A.M.), RD06/0026/0013, and FIS-PI060788 (A.D.) and RD07/0026/2002 (J.S.). I.G.-Y. is a fellow of the Spanish Ministry of Health (FIS), M.S. is funded by S-BIO-0170/2006 (I.L.), and J.G.Z. is supported by the Programme Alban, scholarship No. E07D400805CO.

Disclosures

None.

References

- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317–1329.
- Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, Fischer M, Furlan A, Kaste M, Lees KR, Soehngen M, Warach S. The Desmoteplase In Acute ischemic Stroke trial (DIAS): a Phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke*. 2005;36:66–73.
- Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W. Dose Escalation of Desmoteplase for Acute ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke*. 2006;37:1227–1231.
- Mishra NK, Albers GW, Davis SM, Donnan GA, Furlan AJ, Hacke W, Lees KR. Mismatch-based delayed thrombolysis: a meta-analysis. *Stroke*. 2010;41:e25–e33.
- Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, Davalos A, Fiebach JB, Gruber F, Kaste M, Lipka LJ, Pedraza S, Ringleb PA, Rowley HA, Schneider D, Schwamm LH, Leal JS, Soehngen M, Teal PA, Wilhelm-Ogunbiyi K, Wintermark M, Warach S. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion–diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol*. 2009;8:141–150.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84–91.
- Knight RA, Barker PB, Fagan SC, Li Y, Jacobs MA, Welch KM. Prediction of impending hemorrhagic transformation in ischemic stroke using magnetic resonance imaging in rats. *Stroke*. 1998;29:144–151.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke*. 1982;13:505–508.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985;17:497–504.
- Willing AE. Experimental models: help or hindrance. *Stroke*. 2009;40:S152–S154.
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*. 2007;38:2771–2778.
- Dirnagl U, Pulsinelli W. Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10:327–336.
- McColl BW, Carswell HV, McCulloch J, Horsburgh K. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res*. 2004;997:15–23.
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH. Delayed rt-PA treatment in a rat embolic stroke model: diagnosis and prognosis of ischemic injury and hemorrhagic transformation with magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:964–971.
- Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas JF, Alvarez-Sabin J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32:1079–1084.
- Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:123–135.
- Krishnamurti C, Bolan C, Colleton CA, Reilly TM, Alving BM. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in promoting fibrin deposition in rabbits infused with anecrod or thrombin. *Blood*. 1993;82:3631–3636.
- Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333:1581–1587.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*. 2004;363:768–774.
- Berger C, Fiorelli M, Steiner T, Schabitz WR, Bozzao L, Bluhmki E, Hacke W, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? *Stroke*. 2001;32:1330–1335.
- Molina CA, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Kwiatkowski T, Arenillas JF, Coscojuela P, Romero F, Codina A. Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2002;33:1551–1556.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood–brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med*. 2008;14:731–737.
- Brinker G, Pillekamp F, Hossmann KA. Brain hemorrhages after rt-PA treatment of embolic stroke in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport*. 1999;10:1943–1946.
- Kano T, Katayama Y, Tejima E, Lo EH. Hemorrhagic transformation after fibrinolytic therapy with tissue plasminogen activator in a rat thromboembolic model of stroke. *Brain Res*. 2000;854:245–248.
- Tejima E, Katayama Y, Suzuki Y, Kano T, Lo EH. Hemorrhagic transformation after fibrinolysis with tissue plasminogen activator: evaluation of role of hypertension with rat thromboembolic stroke model. *Stroke*. 2001;32:1336–1340.
- Gautier S, Petrucci O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Baudouin A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R. Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke*. 2003;34:2975–2979.
- Copin JC, Gasche Y. Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats. *Brain Res*. 2008;1243:161–166.
- Saqqur M, Tsivgoulis G, Molina CA, Demchuk AM, Siddiqui M, Alvarez-Sabin J, Uchino K, Calleja S, Alexandrov AV. Symptomatic intracerebral hemorrhage and recanalization after IV rt-PA: a multicenter study. *Neurology*. 2008;71:1304–1312.
- Castellanos M, Sobrino T, Millan M, Garcia M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez de la Ossa N, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Davalos A. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke*. 2007;38:1855–1859.
- Lee KR, Kawai N, Kim S, Sagher O, Hoff JT. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood–brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. *J Neurosurg*. 1997;86:272–278.
- Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke*. 2003;34:2019–2024.
- Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*. 1997;17:5316–5326.
- Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem*. 2003;84:3–9.

“SUPPLEMENTAL MATERIAL”

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult male Swiss mice weighing 25-35 g were used in this study (Jackson Labs, Bar Harbor, Me). All experimental protocols adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense (following EU directives 86/609/CEE and 2003/65/CE). Animals were housed individually under standard conditions of temperature and humidity and a 12h light/dark cycle (lights on at 08:00) with free access to food and water.

Surgical procedures

Middle cerebral artery (MCA) occlusion

Experimental ischemia was carried out as described previously¹. Mice were anesthetized in a chamber ventilated with 2.5% and then, maintained at 1.5-2% isoflurane in a 30%/70% mixture of O₂/NO₂. Body temperature was maintained at 36.5-37°C using a feedback-controlled heating blanket. A catheter was inserted into the tail vein to allow the intravenous administration (200 µL) of vehicle or t-PA.

Animals were placed in a stereotaxic device to prevent any movement, the skin between the right ear and eye was cut, the temporal muscle was retracted and the temporal and parietal bones were exposed. Then a small craniotomy was performed over the artery bifurcation, the meninges were removed and the MCA, with its parietal and frontal branches, was exposed.

Previously, a microneedle was made with hematologic glass capillaries (REF 555/5; Karl Hecht KG Assistant, Germany) using a vertical puller (PC-10; Narishige, Japan), and was pneumatically filled with 2 UI/µl mouse alpha-thrombin (4,045 NIH/mg; Haematologic Technologies Inc., USA). Finally, the pipette was introduced carefully and against the flow into the lumen of the artery bifurcation and 1 µl of mouse alpha-thrombin (2 UI) was injected to induce the formation of a clot *in situ* (Figure 1). The pipette was removed 10 minutes later, time at which the clot had stabilized.

A clot was defined as stable when laser Doppler flowmetry showed a rapid and drastic fall of brain perfusion that remained stable during 60 min (mean reduction of 70-80%) and that was accompanied by a change in the color of the artery.

Measurement of cerebral perfusion

With the purpose of measuring the cerebral perfusion by laser Doppler flowmetry (PeriFlux System 5000; Perimed AB, Sweden), a small hole was performed over the parietal branch and a fiberoptic probe (418-1; Perimed AB, Sweden) was inserted through it. The blood flow was recorded before the injection of thrombin and during 1 hour after artery occlusion or after the beginning of the t-PA infusion (see Supplementary Figure 1).

t-PA-induced thrombolysis

To induce reperfusion, t-PA (10 mg/Kg; Actilyse; Boehringer Ingelheim, Germany; pharmaceutical presentation containing t-PA as well as arginine, dilute phosphoric acid and polysorbate 80 as excipients), was intravenously administered (10% bolus, 90% perfusion during 40 min) at 20 min or 3 hours after the injection of thrombin. The control group received the same volume of vehicle (saline). We defined a reperfusion as effective when the blood flow was recovered (in the range of 60-100% of basal values) and remained stable within the first 60 minutes after t-PA injection.

Experimental groups and exclusion criteria

All the groups were performed and quantified in a randomized fashion by investigators blinded to treatment groups. Animals were allocated by randomization (coin toss) to 5 different groups (see Supplementary Figure 1): a) **MCAO**, in which vehicle was intravenously administered 20 minutes or 3 hours after thrombin injection (n=13); b) **MCAO + t-PA 20min**, in which t-PA was intravenously administered 20 minutes after thrombin injection (n=10); c) **MCAO + t-PA 3h**, where t-PA was intravenously administered 3 hours after thrombin injection (n=8); d) **Spontaneous reperfusion**, a group of mice in which perfusion was transiently arrested but spontaneously returned to basal values in the absence of t-PA within 60 minutes after thrombin injection (n=6), and e) **No**

reperfusion, a group of mice that did not present reperfusion after t-PA injection (n=15). The last two groups were established after the analysis of the results, and were not initially designed.

Some mice were ruled out of further analysis according to the following criteria: a) when MCAO caused an infarct that affected the striatum, probably due to an occlusion of the common trunk of the MCA but also of the lenticulostriatal arteries, b) when mice suffered an extra-parenchymal hemorrhage, probably due to surgical damage of the artery and c) mice with recanalization or occlusion of only one branch of the MCA.

All the studies (determination of infarct size, brain swelling and HT) were performed by investigators blinded to the different treatments.

Neurological deficit evaluation

Prior to sacrifice, 24 hours after surgical procedure, neurological deficit was assessed (n=6) by two independent observers, blinded to animal pharmacological treatment, using a modified neurologic severity score (mNSS)². Supplementary Table I shows a description of the mNSS. Neurologic severity score comprises motor (muscle status, abnormal movement), sensory (visual, tactile and proprioceptive) and reflex tests. In the scale, the severity of injury is defined by the score graded on a range of 0 to 14 (normal score 0, maximal deficit score 14). One point was awarded either for the inability to perform, or for abnormal task performance, or for the lack of a tested reflex.

Determination of infarct size and brain swelling

Twenty-four hours after MCAO, mice were anesthetized again and the wound was reopened to observe whether the vessel was still occluded. After that, animals were sacrificed by an overdose of sodium pentobarbital to assess infarct outcome and were subjected for 10 minutes to transcardial perfusion with phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 to eliminate intravascular blood for further analysis (hemoglobin spectrophotometry). Brain was removed and cut into 1-mm thick coronal slices and stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (1% TTC in 0.1 phosphate buffer). Photographs of each coronal section were made with a digital camera (Nikon Coolpix 990; Nikon corp., Tokyo, Japan), and analyzed using ImageJ 1.41o (NIH, Bethesda, Washington).

Infarct area was delineated and determined (in mm²) by counting the number of pixels within the outline. Infarct volume (in mm³) was calculated as the sum of the orthogonal projections of each damaged area over the section thickness. In order to exclude the brain edema effects, infarct area was corrected by the ratio of the entire area of the ipsilateral hemisphere to that of the contralateral one.

In addition, brain swelling was calculated according to the following formula: (ipsilateral hemispheric volume - contralateral hemispheric volume) / contralateral hemispheric volume x 100³).

Assessment of hemorrhagic transformation

Macroscopic hemorrhage classification

On the digital images, hemorrhages were classified by type and extension, according to previous publications ⁴⁻⁶ in 5 groups: a) Non hemorrhage (NH); b) hemorrhagic infarction type 1 (HI-1), defined as small *petechiae*, generally along the boundary of the infarct; c) hemorrhagic infarction type 2 (HI-2), with more confluent *petechiae* within the damaged area; d) parenchymal hemorrhage type 1 (PH-1), characterized by blood clots in less than 30% of the injured parenchyma; e) parenchymal hemorrhage type 2 (PH-2) with clots in more than 30% of the infarct. Each animal was assigned to one group according to the most severe bleeding.

Histological hemorrhage examination

Twenty-four hours after MCAO, mice were anesthetized again and sacrificed as described above. Brains were taken out and frozen in isopentane. Then, sets of five 50-μm serial sections were obtained, and the first section of every set was stained with cresyl violet (Nissl staining) and diaminobenzidine (DAB).⁷ Diaminobenzidine reacts with peroxidases in red blood cells, and facilitates precise identification of HT, because DAB highlights hemorrhages and leaves non-hemorrhagic areas unstained.⁷

Hemorrhage area

All noticeable hemorrhages, both petechial and parenchymal ones, were quantified on the images of TTC-stained sections as previously described⁸. The

boundary of each bleeding was drawn using ImageJ 1.41o (NIH, Bethesda, Washington). The hemorrhage area (mm²) was calculated by a summation of the area of every bleeding.

Hemoglobin spectrophotometry:

Intracerebral hemorrhage was quantified (n=6) with a spectrophotometric assay previously described^{9, 10}, but modified. Briefly, after transcardial perfusion with phosphate buffer to eliminate intravascular blood, each hemispheric brain tissue was homogenized for 30 seconds in 250 µl of phosphate buffer 0.1 M pH 7.4, followed by sonication on ice for 1 minute and centrifugation at 30,000 g for 30 minutes. The supernatant (10 µl) was reacted with Drabkin's reactive (20 µl, SIGMA, Spain), for 30 minutes at room temperature and finally centrifuged again at 16,000 g for 30 more minutes. Drabkin's reactive converts all hemoglobin forms to cyanometahemoglobin, which presents a maximum absorbance peak near 420 nm. Then, the optical density in this last supernatant was measured at 420 nm with a Nanodrop spectrophotometer¹¹. The relationship between the absorbance and the amount of blood was calculated with a standard curve made by adding a known volume of blood to the contralateral hemispheres. These measurements were performed after TTC staining, because it does not affect the spectrophotometric hemoglobin assay⁹,

10

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± S.D. of the indicated number of experiments; statistical analysis involved one-way analysis of variance (ANOVA, or the Kruskal-Wallis test when the data were not normally distributed) followed by individual comparisons of means (Bonferroni or Dunn's method when the data were not normally distributed) and comparisons between the groups of mice with macroscopic hemorrhage were performed with Fisher's exact test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

REFERENCES

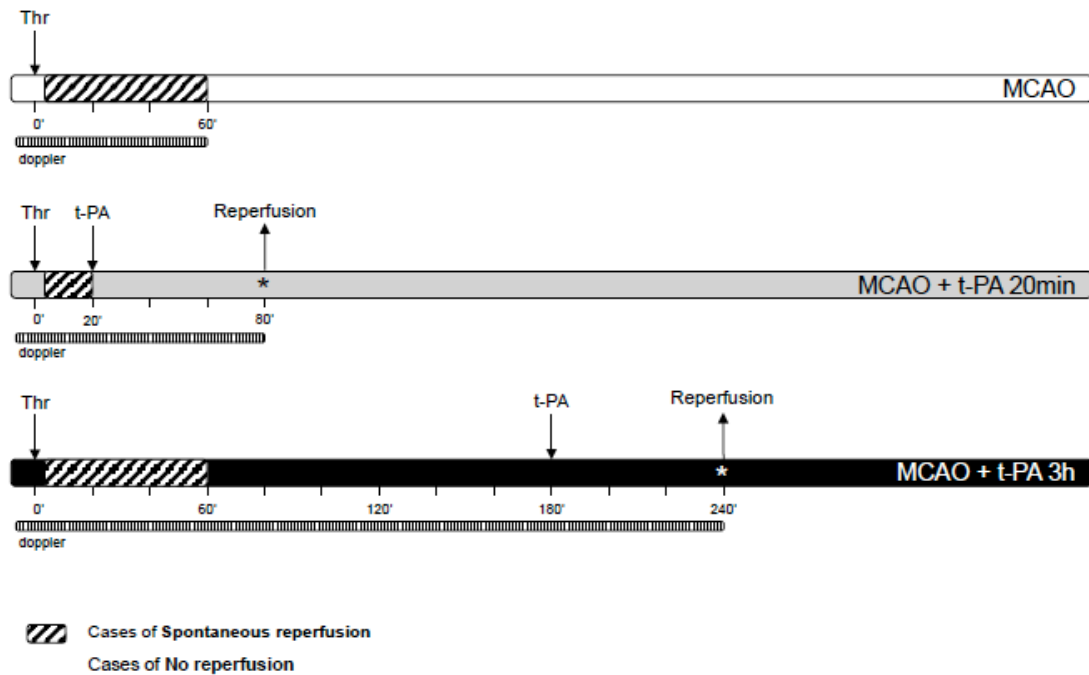
1. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*. 2007;38:2771-2778
2. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1311-1319
3. Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: Effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke*. 1998;29:2171-2180
4. del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, Alberts MJ, Zivin JA, Wechsler L, Busse O, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol*. 1992;32:78-86
5. von Kummer R, Hacke W. Safety and efficacy of intravenous tissue plasminogen activator and heparin in acute middle cerebral artery stroke. *Stroke*. 1992;23:646-652
6. Copin JC, Gasche Y. Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats. *Brain Res*. 2008;1243:161-166
7. Wakisaka Y, Chu Y, Miller JD, Rosenberg GA, Heistad DD. Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:56-69
8. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Increased therapeutic efficacy with rt-pa and anti-cd18 antibody treatment of stroke in the rat. *Neurology*. 1999;52:273-279
9. Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES, Jr., Pinsky DJ. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*. 1997;28:2296-2302
10. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin

trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:452-457

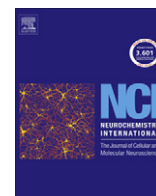
11. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA. Activation of pdgf-cc by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med.* 2008;14:731-737

Supplementary Table I. Modified neurologic severity score for mouse (mNSS)²

| Behavioral test | Score |
|--|------------|
| 1. Motor tests (muscle status-hemiplegia) (normal=0; maximum=6) | 0-6 |
| 1.1. Raising the mouse by the tail: (normal=0; maximum=3) | |
| - Flexion of forelimb | 1 |
| - Flexion of hindlimb | 1 |
| - Head moving more than 10° to the vertical axis within 30 seconds | 1 |
| 1.2. Placing the mouse on the floor: (normal=0; maximum=3) | |
| - Normal walk | 0 |
| - Inability to walk straight | 1 |
| - Circling toward the paretic side | 2 |
| - Falling down to the paretic side | 3 |
| 2. Beam balance tests (normal=0; maximum=6) | 0-6 |
| - Balances with steady posture | 0 |
| - Grasps side of beam | 1 |
| - Hugs the beam and one limb falls down from the beam | 2 |
| - Hugs the beam and two limbs fall down, or spins on beam (>30 s) | 3 |
| - Attempts to balance on the beam but falls off (>20 s) | 4 |
| - Attempts to balance on the beam but falls off (>10 s) | 5 |
| - Falls off: No attempt to balance or hang on to the beam (<10 s) | 6 |
| 3. Reflexes absent (normal=0; maximum=2) | 0-2 |
| - Pinna reflex (a head shake when touching the auditory meatus) | 1 |
| - Corneal reflex (an eye blink when touching the cornea with cotton) | 1 |



Supplementary Figure 1. Design of the study. Animals were allocated to their respective groups by randomization. Five different groups were studied: a) **MCAO**, in which vehicle was intravenously administered 20 minutes or 3 hours after thrombin injection (Thr); b) **MCAO + t-PA 20min**, in which t-PA was intravenously administered 20 minutes after thrombin injection; c) **MCAO + t-PA 3h**, where t-PA was intravenously administered 3 hours after thrombin injection; d) **Spontaneous reperfusion**, a group of mice in which perfusion was transiently arrested but spontaneously returned to basal values in the absence of t-PA within 60 minutes after thrombin injection, and e) **No reperfusion**, a group of mice that did not present reperfusion after t-PA injection. Blood flow was recorded by laser Doppler flowmetry, before the injection of thrombin and during 1 hour after artery occlusion or after the beginning of the t-PA infusion.



Iron overload, measured as serum ferritin, increases brain damage induced by focal ischemia and early reperfusion

Isaac García-Yébenes^a, Mónica Sobrado^a, Ana Moraga^a, Juan G. Zarruk^a, Victor G. Romera^a, Jesús M. Pradillo^a, Natalia Perez de la Ossa^b, María A. Moro^a, Antoni Dávalos^{b,1}, Ignacio Lizasoain^{a,*,1}

^a Unidad de Investigación Neurovascular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Departamento de Neurociencias, Hospital Germans Trias i Pujol, Universidad Autònoma de Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2012

Received in revised form 13 September 2012

Accepted 24 September 2012

Available online 2 October 2012

Keywords:

Blood–brain barrier

Edema

Haemorrhagic transformation

Mice

Thrombin

ABSTRACT

High levels of iron, measured as serum ferritin, are associated to a worse outcome after stroke. However, it is not known whether ischemic damage might increase ferritin levels as an acute phase protein or whether iron overload affects stroke outcome. The objectives are to study the effect of stroke on serum ferritin and the contribution of iron overload to ischemic damage.

Swiss mice were fed with a standard diet or with a diet supplemented with 2.5% carbonyl iron to produce iron overload. Mice were submitted to permanent (by ligature and by *in situ* thromboembolic models) or transient focal ischemia (by ligature for 1 or 3 h).

Treatment with iron diet produced an increase in the basal levels of ferritin in all the groups. However, serum ferritin did not change after ischemia. Animals submitted to permanent ischemia had the same infarct volume in the groups studied. However, in mice submitted to transient ischemia followed by early (1 h) but not late reperfusion (3 h), iron overload increased ischemic damage and haemorrhagic transformation.

Iron worsens ischemic damage induced by transient ischemia and early reperfusion. In addition, ferritin is a good indicator of body iron levels but not an acute phase protein after ischemia.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Iron is an essential element for life that catalyses many biological reactions due its dual redox nature. However, iron is also able to produce free radicals and oxidative stress. In order to avoid this harmful effect, the organism has developed a set of mechanisms that keep free iron under toxic levels (Eisenstein, 2000; Moos et al., 2007; MacKenzie et al., 2008). Among them, ferritin is one of these mechanisms, being responsible for storing excess iron inside the cells, avoiding free radicals production from free iron. Indeed, serum ferritin is a reliable index of iron stores under healthy conditions (Wang et al., 2010) but it is also a well-known protein of acute phase, synthesized in the liver as a part of the systemic response to infection (Beard et al., 2006).

In this context, brain has one of the highest rates of metabolic activity and for that reason it has the second greatest amount of

iron after the liver. It has been suggested that the impairment of iron homeostasis and its consequent accumulation could be a very important factor as a trigger or mediator in many neurodegenerative disorders (for revision see Berg and Yodanis, 2006; Jomova et al., 2010). Despite the fact that the specific mechanisms have to be elucidated, it seems clear that cerebral ischemia also impairs iron homeostasis, leading to iron release in the ischemic tissue and therefore to an increased oxidative damage (Ishimaru et al., 1996).

Some clinical studies have found that high levels of iron stores, measured by serum ferritin, are associated with poor outcome after ischemic stroke (Dávalos et al., 1994, 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Millan et al., 2007, 2008) and intracerebral haemorrhage (Mehdiratta et al., 2008; Perez de la Ossa et al., 2010). However, direct evidences of iron toxicity after experimental stroke are controversial. Some groups have shown that iron overload increases brain damage after ischemia (Castellanos et al., 2002; Mehta et al., 2004), whereas others failed to show this detrimental effect (Christensen et al., 2002; Millerot et al., 2005).

Therefore, the role of iron in stroke is unclear and needs to be clarified. The main two goals of the present study are: (a) to describe the kinetic of serum ferritin after stroke to clarify whether ferritin is an acute phase protein after stroke or is a reliable marker of iron stores and (b) to study the consequences of iron overload

Abbreviations: IST, *in situ* thromboembolic model; mNSS, modified neurologic score severity; pMCAO, permanent middle cerebral artery occlusion; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3941465; fax: +34 91 3941464.

E-mail address: ignacio.lizasoain@med.ucm.es (I. Lizasoain).

¹ These two authors co-chaired the research project.

after cerebral ischemia in mice, attending primarily to the lesion size and haemorrhagic transformation.

2. Material and methods

2.1. Animals and diet

Male Swiss mice (Harlan laboratories, Barcelona, Spain) were used for this study according to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense (following EU directives 86/609/EEC and 2003/65/EC). One-month-old animals, weighing 15 g, were assigned by randomization to two groups fed with different diets for nine weeks. Control group received a standard diet for rodent maintenance (2014, Harlan laboratories), containing 50 mg of Fe per kg. Iron overload group was fed with a diet supplemented with an additional 2.5% of carbonyl iron (TD 08704, Harlan) (Castellanos et al., 2002). Finally, after the feeding period, 3–5-month-old mice weighing 35–45 g were used for this experimental study. During all the procedures, animals were kept under standard conditions of humidity, ventilation and temperature, with a 12 h dark/light cycle (on at 8:00 h) and with free access to food and water.

2.2. Experimental groups

Animals were assigned by randomization to five further different groups: IST-pMCAO, in which the MCA was permanently occluded using the *in situ* thromboembolic (IST) model (Orset et al., 2007; García-Yébenes et al., 2011); Lig-pMCAO, Lig-1hMCAO, Lig-3hMCAO where the ischemia was achieved by permanent or transient ligation (Lig) (Chen et al., 1986; Zarruk et al., 2012) of the MCA for one and three hours respectively, and Sham group in which the MCA was just exposed but not occluded.

In the IST-pMCAO group, ischemia was carried out as previously described (Orset et al., 2007; García-Yébenes et al., 2011). Mouse alpha-thrombin (2 UI) was injected into the MCA to induce a clot. A clot was defined as stable when laser Doppler flowmetry displayed a drastic fall of brain perfusion (mean reduction of 70–80%) that remained stable during 60 min. Animals with spontaneous reperfusion (20%) were excluded of further analysis being finally $n = 5$ per group.

In the Lig-MCAO groups, the MCA and the ipsilateral common carotid were tied either permanently (Lig-pMCAO) or for one (Lig-1hMCAO) or three hours (Lig-3hMCAO) (Chen et al., 1986; Zarruk et al., 2012). Considering the distal ligation of the MCA as a cortical model, animals with striatal lesion were excluded of further analysis (7%), being $n = 6$ –7 in Lig-pMCAO and Lig-3hMCAO groups, and $n = 11$ in Lig-1hMCAO groups.

Animals in which both carotid and middle cerebral arteries were exposed but not occluded were considered as Sham group. Before all the surgical procedures mice were anaesthetised in a chamber ventilated with 2.5% and then maintained at 1.5–2% isoflurane in a 30/70% mixture of O₂/air. Body temperature was maintained at 36.5–37 °C using a feedback-controlled heating blanket. No spontaneous mortality was found after MCAO and this was unaffected by the different experimental treatments.

Physiological parameters (pH, pCO₂, pO₂, haematocrit, haemoglobin and mean arterial blood pressure) were measured in a different group of mice, $n = 4$ and were not significantly different between iron overload and control animals, at both times studied (basal and 15 min after ischemia; Table 1).

2.3. Blood samples collection and measurement of serum ferritin

Blood tail samples were collected the day before ($t = 0$), 3 and 24 h after the surgery and kept at room temperature for 1 h and

at 4 °C overnight, allowing coagulation. Then, samples were centrifuged at 1500g and 4 °C, and finally serum was extracted and kept at –80 °C until its use. Serum ferritin was measured by a blinded investigator, using an ELISA kit (E-90F, Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg, OR, USA) and expressed as normalised values by basal control levels ($n = 4$ per group).

2.4. Neurological deficit evaluation

Functional outcome was assessed 24 h after ischemia by a blinded observer using a modified neurologic score severity (mNSS) (Li et al., 2000; Zarruk et al., 2011). Neurologic score severity comprises motor, sensory and reflex tests.

2.5. Determination of infarct size, brain swelling and haemorrhagic areas

Twenty-four hours after MCAO, mice were sacrificed by an overdose of sodium pentobarbital to assess infarct outcome and were transcardially perfused with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to eliminate intravascular blood for further analysis. Then, brain was removed, cut into 1-mm thick coronal slices and stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (1% TTC in 0.2 M phosphate buffer). Photographs of each coronal section were made with a digital camera and analysed using Image J 1.44 k (NIH, Bethesda, Washington). All the determinations were measured by a blinded investigator.

Infarct volume was measured as previously reported (García-Yébenes et al., 2011). Infarct area was delineated and determined (in mm²) by counting the number of pixels within the outline. Infarct volume (in mm³) was calculated as the sum of the orthogonal projections of each damaged area over the section thickness. In order to exclude the brain edema effects, infarct area was corrected by the ratio of the entire area of the ipsilateral hemisphere to that of the contralateral one.

In addition, brain swelling was calculated according to the following formula: (ipsilateral hemispheric volume – contralateral hemispheric volume)/contralateral hemispheric volume $\times 100$ (Maier et al., 1998).

All noticeable haemorrhages, both petechial and parenchymal ones, were quantified on all the images of TTC-stained sections as previously described (Zhang et al., 1999; García-Yébenes et al., 2011). The boundary of each bleeding was drawn using Image J 1.44 k. The haemorrhage area (mm²) was calculated by a summation of the area of every bleeding.

2.6. Statistics

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Two way analysis of variance (two way ANOVA) with Bonferroni's test as *post hoc* was performed to analyse differences between serum ferritin values and the rostro-caudal distribution of the infarction. ANOVA with Bonferroni's test as *post hoc* (or Kruskal–Wallis with Dunn's test as *post hoc* when data were not normally distributed) was used to analyse differences between groups. Mann–Whitney test was used for comparison of two groups. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Effect of iron overload and ischemic stroke on serum ferritin levels

Iron overload produced a significant increase on the basal levels of serum ferritin in all the groups studied ($100 \pm 11\%$ in control group vs. $380 \pm 20\%$ in iron overload group, $p < 0.05$; basal level

Table 1
Physiological Parameters.

| | Control basal | Control 15 min post | Iron overload basal | Iron overload 15 min post |
|------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| pH | 7.37 ± 0.06 | 7.28 ± 0.03 | 7.34 ± 0.03 | 7.30 ± 0.04 |
| pCO ₂ | 30.2 ± 2.7 | 34.7 ± 1.6 | 35.7 ± 1.7 | 30.9 ± 4.7 |
| pO ₂ | 161 ± 8 | 151 ± 17 | 167 ± 12 | 176 ± 24 |
| Htc | 36.2 ± 2.2 | 36.2 ± 18 | 37.0 ± 1.2 | 36.0 ± 2.0 |
| Hb | 12.3 ± 0.8 | 12.4 ± 0.5 | 12.6 ± 0.4 | 12.2 ± 0.6 |
| MABP | 73.6 ± 5.0 | 71.3 ± 4.3 | 67.8 ± 1.3 | 71.9 ± 6.5 |

Values are expressed as mean ± SEM, *n* = 4.

MABP indicates mean arterial blood pressure; Htc, hematocrit; Hb, haemoglobin.

in control group was 170 ± 19 ng/ml; Fig. 1A and B). However, serum ferritin levels did not change after permanent or transient ischemia in any group at both times studied (Fig. 1A and B).

3.2. Effect of iron overload on infarct outcome

Animals submitted to permanent ischemia had the same infarct volume and neurological deficits, either in the *in situ* thromboembolic model (IST-pMCAO: 14.2 ± 1.3% vs. 14.9 ± 1.3%, *p* > 0.05) or in the ligature model (Lig-pMCAO: 14.7 ± 1.8% vs. 15.4 ± 2.1%, *p* > 0.05), with or without iron overload, respectively (Fig. 2A and 2B).

Mice submitted to transient ischemia followed by late reperfusion had also the same infarct outcome either in control or iron overload group (Lig-3hMCAO: 14.4% ± 1.2% vs 13.3% ± 1.8% respectively, *p* > 0.05; Fig. 2).

Transient occlusion of the arteries only for 1 h followed by reperfusion resulted in a smaller infarct when compared with permanent occlusion groups (*p* < 0.05 vs. Lig-pMCAO and IST-MCAO). However, in this group (Lig-1hMCAO), iron overload was associated to increased infarct volume when compared with the normal diet group (11.4 ± 1.6% vs 5.5 ± 1.2%, *p* < 0.05 vs control group; Fig. 2A and B). The increment in infarct volume caused by iron overload was 207%. No differences were found on neurological deficits in any group.

3.3. Effect of iron overload on haemorrhagic transformation

Mild signs of bleeding were observed after permanent ischemia in both models used and after transient ischemia and late reperfu-

sion (Fig. 3A and B). Iron overload did not change either haemorrhage area (Fig. 3A) or brain swelling (Fig. 3B, *p* > 0.05).

However, in animals submitted to transient ischemia and early reperfusion, iron overload treatment caused an increase in haemorrhage area (*p* < 0.05 vs. control group, Fig. 3A) and also in brain swelling (*p* < 0.05 vs. control group, Fig. 3B).

4. Discussion

Our results clearly show that serum ferritin is a reliable marker of iron levels but it is not an acute phase reactive protein after a mild-moderate ischemia. We have also demonstrated that iron overload worsens ischemic damage induced by transient ischemia followed by early reperfusion. These results might suggest that iron plays an important role in penumbra evolution to infarct and subsequent worsening in the outcome after stroke.

Serum ferritin has been widely used in clinical medicine to measure iron stores and detect iron overload, as is the case in hemochromatosis. Indeed, we have now demonstrated that serum ferritin is a good marker of iron levels. However, ferritin is also an acute phase protein (Beard et al., 2006) and, as such, its levels might elevate as a result of the ischemia. In this context, using permanent and transient models of ischemia that produce a moderate ischemic insult, we have found high levels of ferritin only in the group of animals treated with iron overload. Furthermore, our results show that there is no increase in serum ferritin levels after a mild-moderate ischemia. Our data are in agreement with both experimental and clinical data: Millerot et al. (2005) found that serum ferritin remains stable after induction of a moderate ischemic insult by using different models of ischemia (brain

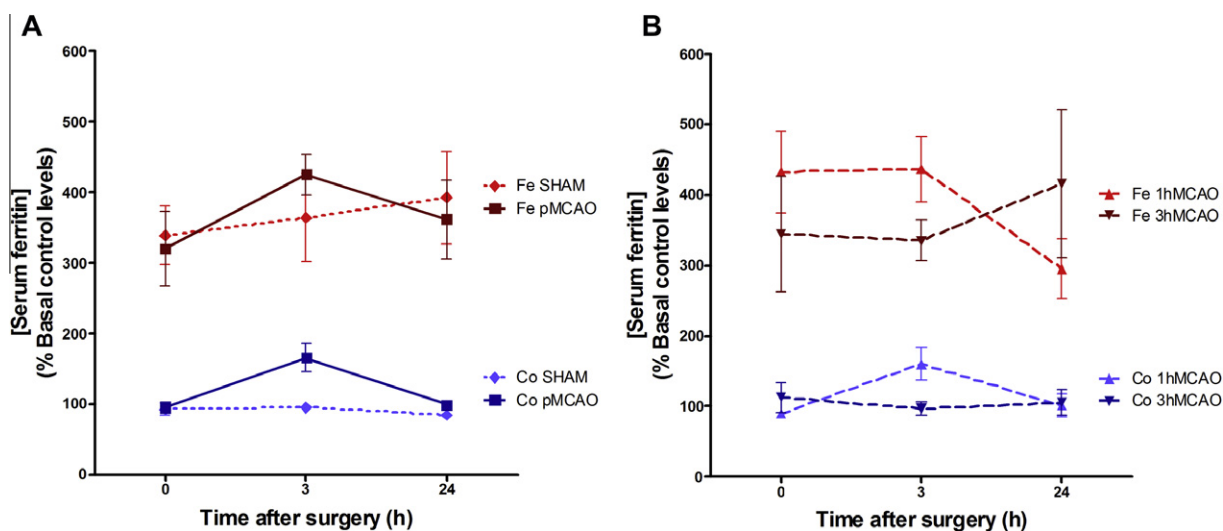


Fig. 1. Effect of iron overload and ischemic stroke on serum ferritin levels. Serum ferritin was measured before (*t* = 0) and 3 and 24 h after the surgery in animals with control (Co) or iron overload (Fe) diet. Levels of serum ferritin in animals after Sham and permanent ischemia (pMCAO; A) and after 3 and 1 h of transient occlusion (3hMCAO, 1hMCAO; B) For details see Methods. Data are expressed as mean ± SEM, *n* = 5–6 per time point in each group.

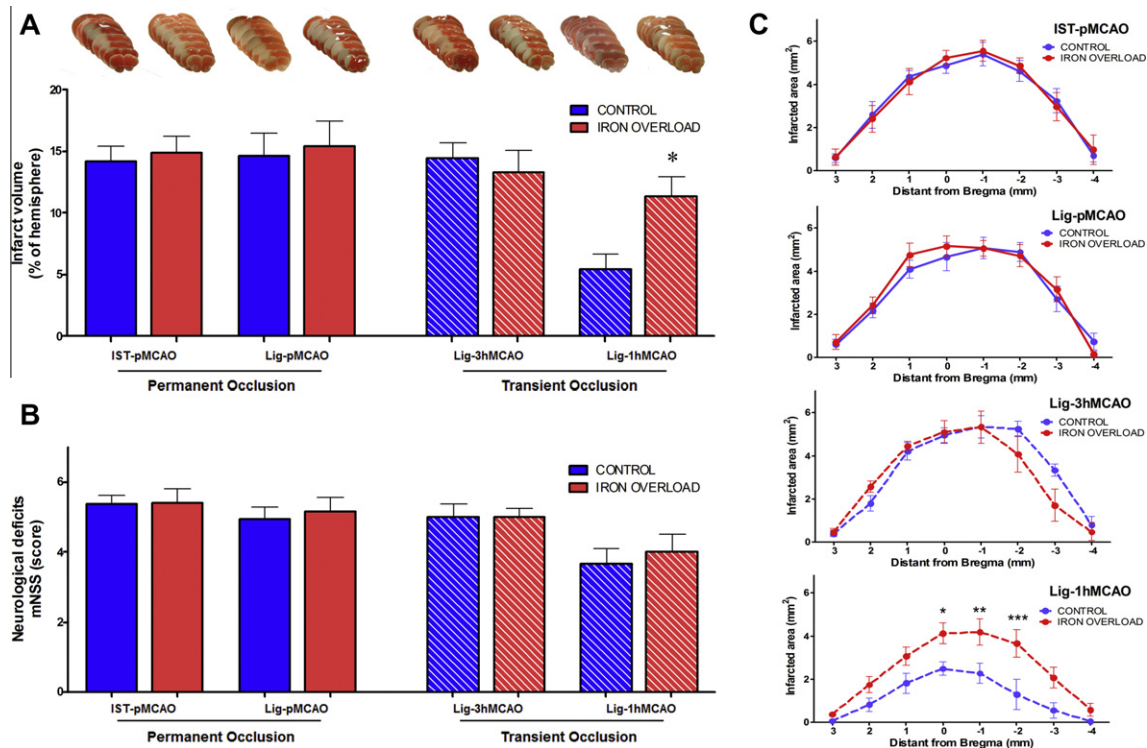


Fig. 2. Effect of iron overload on infarct outcome. Infarct outcome was measured 24 h after permanent and transient ischemia. (A) Infarct volume with representative slices, (B) neurological deficits and (C) infarct area. Permanent ischemia was performed by using the *in situ* thromboembolic (IST-pMCAO, $n = 5$) and by using a permanent ligature Lig-pMCAO, $n = 6-7$). Transient ischemia was achieved by using a transient ligature for 3 and 1 h of occlusion (Lig-3hMCAO, $n = 6-7$; Lig-1hMCAO $n = 11$, respectively). For details see methods. Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$.

embolization, photothrombotic occlusion of cortical vessels or four-vessel occlusion). We also demonstrated, in a clinical study, that serum ferritin levels do not change during the first 2 days after stroke (Armengou et al., 1998; Millan et al., 2007).

We cannot discard that serum ferritin might act as a marker of stroke severity, in particular after severe stroke. Indeed, Millerot et al. (2005) also found that serum ferritin can be increased after a severe stroke (lesions around 60–90% of hemisphere). Several clinical studies, including ours, also support this hypothesis because it has been described a positive association between serum ferritin levels, extent of tissue damage and strength of the inflammation response evaluated by serum C-reactive protein or interleukin-6 levels (Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Millan et al., 2007; Perez de la Ossa et al., 2010; Choi et al., 2012).

The role of iron in stroke is still controversial despite the clinical and experimental work performed. We have now demonstrated that iron overload only increases cerebral damage induced by transient ischemia for 1 h but not for 3 h or by permanent ischemia (using two different cortical models). The main difference between the models used is: (a) in the permanent occlusion the penumbra has a very fast evolution to death tissue, (b) in the transient ischemia with late reperfusion (3 h of occlusion) the majority of the penumbra is already infarcted when the recanalization takes place and (c) early reperfusion of occluded vessel produces a mild infarct with an evident penumbra area as we have recently demonstrated (Sobrado et al., 2011). Thus, these results suggest that iron could play a key role during the first hours after ischemia, a period in which oxidative stress has a predominant role accelerating the recruitment of the compromised tissue to definitive infarction. In fact, excessive iron is toxic because it catalyses the Fenton reaction which produces highly reactive hydroxyl radicals that lead to oxidative stress, ROS formation and growth of the penumbra area (for review see Fraser, 2011). Furthermore, hydroxyl radicals generated

by free iron might have an additional role in disrupting the blood–brain barrier and thus producing edema. Indeed, our results also show an increased brain edema and haemorrhage area in the iron overload group. This could explain the reported neuroprotective effect of some chelating agents by decreasing ROS production (Patt et al., 1990; Jacobsen et al., 1992; Rosenthal et al., 1992; Soloniuk et al., 1992; Yamamoto et al., 1997; van der Worp et al., 1999; Demougeot et al., 2004).

However our results do not prove a deleterious effect of iron in permanent or late reperfusion and this seems to be contradictory with previous clinical data (Davalos et al., 1994, 2000; Erdemoglu and Ozbakir, 2002; Millan et al., 2007, 2008), which demonstrate that high iron levels (serum ferritin) are associated with worse outcome. Most of them are based in not t-PA treated patients, so permanent ischemia or late reperfusion has to be assumed. The main difference between all these clinical evidences and our results is that we are analysing the effect in the first 24 h after stroke and clinical data reflect the evolution in the first 2–5 days. So, we cannot discard a secondary damage related with iron overload after the first 24 h of ischemia. Indeed, it has been demonstrated that high iron overload has no effect in the first 24 h after ICH, but it is associated with a worse edema at 3–4 days (Mehdiratta et al., 2008). Experimental data have also proved this detrimental effect at later times (Castellanos et al. 2002; Mehta et al. 2004). The characteristics of the infarcts can also explain the differences between our experimental data with previous clinical data. We have used stroke models that only caused cortical infarcts, in contrast with, the different location and size of the infarcts found in clinical studies.

Finally, it is also unknown the mechanism by which iron overload produces damage after stroke. Brain is protected against changes in circulating iron levels mainly by a rapid sequestration and inactivation of free iron by cerebral endothelial cells (Deane

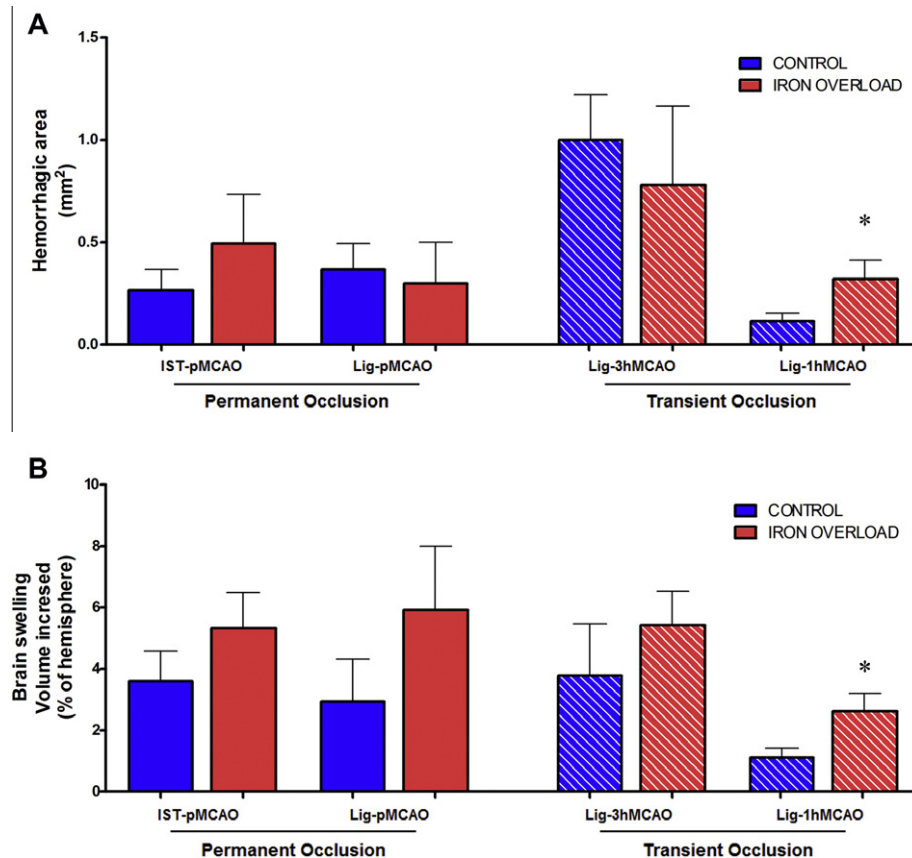


Fig. 3. Effect of iron overload on haemorrhagic transformation after permanent and transient ischemia. Hemorrhage area (A) and brain swelling (B) were measured 24 h after the insult. Permanent ischemia was performed by using the *in situ* thromboembolic (IST-pMCAO) and by using a permanent ligature Lig-pMCAO). Transient ischemia was achieved by using a transient ligature for 3 and 1 h of occlusion (Lig-3hMCAO; Lig-1hMCAO respectively). For details see Methods. Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$.

et al., 2004); in fact, this reason might explain why patients with hereditary or secondary hemochromatosis do not present neurologic symptoms (Eaton and Qian, 2002). Therefore, the detrimental effect of iron overload on brain damage induced by ischemia is likely to originate from systemic iron pools reaching the brain parenchyma or from iron which is released from its binding proteins. In both cases, iron has to reach the brain parenchyma through an altered brain–blood barrier, as it is the case after ischemia. It has been demonstrated that brain free iron levels in ischemic penumbra are increased as soon as 1 h (Millerot-Serruot et al., 2008). The fact that iron is increased very soon after ischemia also suggests that iron binding proteins, such as ferritin or transferrin, might cross the altered brain–blood barrier and then release iron into the parenchyma during the first hours after ischemia due to the local acidosis. However, this point is also controversial because it has been reported that infarct lesion is inversely associated with levels of transferrin in acute stroke patients, suggesting that transferrin may play a protective role in the early phases of stroke progression limiting damage extension by its capacity to reduce iron availability (Altamura et al., 2009).

In summary, to our knowledge the present study is the first that compares the effect of iron overload on focal cerebral ischemia using different permanent and transient cortical stroke models. Our results clearly show that serum ferritin is still a reliable marker of iron stores after a mild-moderate ischemia. Besides, our results suggest that iron overload may cause an accelerated death of the compromised tissue and that iron toxicity can be one of the first triggers of the ischemic cascade.

Acknowledgements

The authors have no conflict of interest to declare. The authors thank Dr. T Sobrino for his help in determination of serum ferritin levels. This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, FIS-PI060788 (AD), from Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) SAF2009-08145 (MAM) and SAF2011-23354 (IL) and from both Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and MICINN RENEVAS RD06/0026/0005 (IL), RD06/0026/0013 (AD) and CSD2010-00045 (MAM). IGY is fellow of the Instituto de Salud Carlos III (FIS). JGZ was supported by the Programme Alban, scholarship No. E07D400805CO.

References

- Altamura, C., Squitti, R., Pasqualetti, P., Gaudino, C., Palazzo, P., Tibuzzi, F., Lupoi, D., Cortesi, M., Rossini, P.M., Vernieri, F., 2009. Ceruloplasmin/transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke* 40, 1282–1288.
- Armengou, A., Davalos, A., Fernandez-Real, J.M., Castillo, J., 1998. Serum ferritin concentrations are not modified in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* 29, 258–260.
- Beard, J.L., Murray-Kolb, L.E., Rosales, F.J., Solomons, N.W., Angelilli, M.L., 2006. Interpretation of serum ferritin concentrations as indicators of total-body iron stores in survey populations: the role of biomarkers for the acute phase response. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 1498–1505.
- Berg, D., Youdim, M.B., 2006. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top. Magn. Reson. Imaging* 17, 5–17.
- Castellanos, M., Puig, N., Carbonell, T., Castillo, J., Martinez, J., Rama, R., Davalos, A., 2002. Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 952, 1–6.

- Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricq, H., Balentine, J.D., 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738–743.
- Choi, K.H., Park, M.S., Kim, J.T., Nam, T.S., Choi, S.M., Kim, B.C., Kim, M.K., Cho, K.H., 2012. The serum ferritin level is an important predictor of hemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke. *Eur. J. Neurol.* 19, 570–577.
- Christensen, H., Boysen, G., Johannesen, H.H., Christensen, E., Bendtzen, K., 2002. Deteriorating ischaemic stroke. cytokines, soluble cytokine receptors, ferritin, systemic blood pressure, body temperature, blood glucose, diabetes, stroke severity, and CT infarction-volume as predictors of deteriorating ischaemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 201, 1–7.
- Davalos, A., Castillo, J., Marrugat, J., Fernandez-Real, J.M., Armengou, A., Cabellos, P., Rama, R., 2000. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54, 1568–1574.
- Davalos, A., Fernandez-Real, J.M., Ricart, W., Soler, S., Molins, A., Planas, E., Genis, D., 1994. Iron-related damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 25, 1543–1546.
- Deane, R., Zheng, W., Zlokovic, B.V., 2004. Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. *J. Neurochem.* 88, 813–820.
- Demougeot, C., Van Hoecke, M., Bertrand, N., Prigent-Tessier, A., Mossiat, C., Beley, A., Marie, C., 2004. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 1080–1087.
- Eaton, J.W., Qian, M., 2002. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 833–840.
- Eisenstein, R.S., 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 627–662.
- Erdemoglu, A.K., Ozbakir, S., 2002. Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur. J. Neurol.* 9, 633–637.
- Fraser, P.A., 2011. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 967–977.
- García-Yébenes, I., Sobrado, M., Zarruk, J.G., Castellanos, M., Perez de la Ossa, N., Davalos, A., Serena, J., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2011. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42, 196–203.
- Ishimaru, H., Ishikawa, K., Ohe, Y., Takahashi, A., Tatemoto, K., Maruyama, Y., 1996. Activation of iron handling system within the gerbil hippocampus after cerebral ischemia. *Brain Res.* 726, 23–30.
- Jacobsen, E.J., VanDoornik, F.J., Ayer, D.E., Belonga, K.L., Braugher, J.M., Hall, E.D., Houser, D.J., 1992. 2-(Aminomethyl)chromans that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma and ischemia. *J. Med. Chem.* 35, 4464–4472.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., Valko, M., 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 345, 91–104.
- Li, Y., Chopp, M., Chen, J., Wang, L., Gautam, S.C., Xu, Y.X., Zhang, Z., 2000. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1311–1319.
- MacKenzie, E.L., Iwasaki, K., Tsuji, Y., 2008. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal* 10, 997–1030.
- Maier, C.M., Ahern, K., Cheng, M.L., Lee, J.E., Yenari, M.A., Steinberg, G.K., 1998. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 29, 2171–2180.
- Mehdiratta, M., Kumar, S., Hackney, D., Schlaug, G., Selim, M., 2008. Association between serum ferritin level and perihematoma edema volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 39, 1165–1170.
- Mehta, S.H., Webb, R.C., Ergul, A., Tawfik, A., Dorrance, A.M., 2004. Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R283–288.
- Millan, M., Sobrino, T., Arenillas, J.F., Rodriguez-Yanez, M., Garcia, M., Nombela, F., Castellanos, M., de la Ossa, N.P., Cuadras, P., Serena, J., Castillo, J., Davalos, A., 2008. Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. *Dis. Markers* 25, 181–188.
- Millan, M., Sobrino, T., Castellanos, M., Nombela, F., Arenillas, J.F., Riva, E., Cristobo, I., Garcia, M.M., Vivancos, J., Serena, J., Moro, M.A., Castillo, J., Davalos, A., 2007. Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. *Stroke* 38, 90–95.
- Millerot, E., Prigent-Tessier, A.S., Bertrand, N.M., Faure, P.J., Mossiat, C.M., Giroud, M.E., Beley, A.G., Marie, C., 2005. Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1386–1393.
- Millerot-Serruot, E., Bertrand, N., Mossiat, C., Faure, P., Prigent-Tessier, A., Garnier, P., Bejot, Y., Giroud, M., Beley, A., Marie, C., 2008. Temporal changes in free iron levels after brain ischemia relevance to the timing of iron chelation therapy in stroke. *Neurochem. Int.* 52, 1442–1448.
- Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjorringe, T., Morgan, E.H., 2007. Iron trafficking inside the brain. *J. Neurochem.* 103, 1730–1740.
- Orset, C., Macrez, R., Young, A.R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., Agin, V., Vivien, D., 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38, 2771–2778.
- Patt, A., Horesh, I.R., Berger, E.M., Harken, A.H., Repine, J.E., 1990. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J. Pediatr. Surg.* 25, 224–227 (discussion 227–228).
- Perez de la Ossa, N., Sobrino, T., Silva, Y., Blanco, M., Millan, M., Gomis, M., Agulla, J., Araya, P., Reverte, S., Serena, J., Davalos, A., 2010. Iron-related brain damage in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41, 810–813.
- Rosenthal, R.E., Chanderbhan, R., Marshall, G., 1992. Prevention of post-ischemic brain lipid conjugated diene production and neurological injury by hydroxyethyl starch-conjugated deferoxamine. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 29–33.
- Sobrado, M., Delgado, M., Fernandez-Valle, E., Garcia-Garcia, L., Torres, M., Sanchez-Prieto, J., Vivancos, J., Manzanares, R., Moro, M.A., Pozo, M.A., Lizasoain, I., 2011. Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage* 57, 45–54.
- Soloniuk, D.S., Perkins, E., Wilson, J.R., 1992. Use of allopurinol and deferoxamine in cellular protection during ischemia. *Surg. Neurol.* 38, 110–113.
- van der Worp, H.B., Thomas, C.E., Kappelle, L.J., Hoffman, W.P., de Wildt, D.J., Bar, P.R., 1999. Inhibition of iron-dependent and ischemia-induced brain damage by the alpha-tocopherol analogue MDL 74,722. *Exp. Neurol.* 155, 103–108.
- Wang, W., Knovich, M.A., Coffman, L.G., Torti, F.M., Torti, S.V., 2010. Serum ferritin: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 760–769.
- Yamamoto, T., Yuki, S., Watanabe, T., Mitsuka, M., Saito, K.I., Kogure, K., 1997. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 762, 240–242.
- Zarruk, J.G., Fernandez-Lopez, D., Garcia-Yébenes, I., Garcia-Gutierrez, M.S., Vivancos, J., Nombela, F., Torres, M., Burguete, M.C., Manzanares, J., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2012. Cannabinoid Type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke* 43, 211–219.
- Zarruk, J.G., García-Yébenes, I., Romera, V.G., Ballesteros, I., Moraga, A., Cuartero, M.I., Hurtado, O., Sobrado, M., Pradillo, J.M., Fernandez-Lopez, D., Serena, J., Castillo-Melendez, M., Moro, M.A., Lizasoain, I., 2011. Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke. *Rev. Neurol.* 53, 607–618.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Chopp, M., 1999. Increased therapeutic efficacy with rt-PA and anti-CD18 antibody treatment of stroke in the rat. *Neurology* 52, 273–279.